

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

**Identifikace fenolických látek v rostlinných
extraktech s využitím UHPLC-MS/MS**
(diplomová práce)

Pod'akovanie:

Ďakujem všetkým, ktorý sa podieľali na vytvorení tejto diplomovej práce, predovšetkým mojej školiteľke Doc. PharmDr. Lucii Novákovej, Ph.D. za množstvo času, ktoré mi venovala pri zodpovedaní odborných i praktických otázok pri spracovaní diplomovej práce, za jej vedenie, pripomienky, návrhy a trpezlivosť. Pod'akovanie ďalej patrí mojej rodine a priateľom za ich neustálu morálnu podporu.

Prehlásenie:

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a sú v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové, 7. 5. 2013

Ivana Kmeťová

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: *Ivana Kmeťová*

Školitel: *Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.*

Názov diplomovej práce: *Identifikace fenolických látek v rostlinných extraktech s využitím UHPLC-MS/MS*

Cieľom tejto diplomovej práce bola identifikácia fenolických látok v suchom lyofilizovanom vodnom extrakte z listov jahody obyčajnej (*Fragaria Vesca L.*) s použitím ultra-vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie spojenej s elektrosprejovou tandemovou hmotnostnou spektrometriou (UHPLC-ESI-MS/MS), ktorá poskytuje výhody pri identifikácii komplexných rastlinných vzoriek.

Fenolické zlúčeniny reprezentujú skupinu vysoko komplexných prirodzene sa vyskytujúcich molekúl v rastlinách, ktoré majú širokú škálu biologických a fyziologických funkcií a slúžia ako chemotaxonomické markerové zlúčeniny. Táto práca bola zameraná na flavonoidy a im príbuzné látky.

Pre separáciu bola použitá UHPLC miesto bežnejšej HPLC pre svoju oveľa vyššiu separačnú účinnosť, ktorá je kľúčová pri úspešnej separácii komplexných vzoriek. Navyše, UHPLC umožnila skrátiť dobu analýzy. Určenie štruktúry fenolických zlúčenín bolo založené na vyhodnotení a porovnaní MS a MS/MS spektier v pozitívnom i v negatívnom iónovom režime ESI. Využitie boli základné skeny, skeny produktových iónov, skeny neutrálnych strát a rekonštruované iónové chromatogramy vybraných hmotností (RIC). Posledne menované boli veľmi dôležité pre identifikáciu zlúčenín prítomných v malom množstve. Skeny neutrálnych strát boli obzvlášť cenné pre identifikáciu sacharidovej časti v štruktúre fenolických zlúčenín. Pre niektoré štruktúry boli taktiež dostupné referenčné štandardy, preto bola ich identifikácia vykonaná pomocou MS dát a retenčných časov.

UHPLC-MS/MS analýza suchého jahodového extraktu viedla k predbežnej charakterizácii niekoľkých fenolických zlúčenín, vrátane katechínu, flavonoidov peltatosidu a tilirosidu, aglykonov kaempferolu a quercetínu a ich derivátov. Pozícia sacharidovej časti na flavonoidnom skelete bola určená len pre zlúčeniny, pre ktoré boli k dispozícii referenčné štandardy.

Kľúčové slová: UHPLC- MS/MS, *Fragaria vesca*, fenolické látky, sken produktových iónov, neutrálna strata

Abstract

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: *Ivana Kmeťová*

Supervisor: *Doc. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.*

Title of Diploma thesis: *Identification of phenolic compounds in plant extracts using UHPLC-MS/MS*

The aim of this Diploma thesis was identification of phenolic compounds in dry lyophilized water extract of leaves of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) using ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS), advantageous in identification of complex plant samples.

Phenolic compounds represent a group of very complex naturally occurring molecules in plants, possessing a wide variety of biological and physiological functions and acting as chemotaxonomic marker substances. This work was focused on flavonoids and related substances.

For separation, UHPLC was used instead of more common HPLC due to its much higher separation efficiency that is crucial for successful separation of complex samples. Moreover, UHPLC enabled reduction of analysis time. Determination of structures of phenolics was based on evaluation and comparison of MS and MS/MS spectra in both negative and positive ESI ion modes. Full scan spectra, product ion spectra, neutral loss scans and reconstructed ion chromatograms of selected masses were used. The latter was very important in order to identify low abundant compounds. Neutral loss scan was especially valuable for the identification of sugars in the structure of phenolic compounds. For some structures also reference standards were available, therefore the identification was performed using MS data and retention times as well.

UHPLC-MS/MS analysis of dry strawberry extract led to tentative characterization of variety of phenolic compounds including catechin, flavonoids peltatoside and tiliroside, aglycons of kaempferol and quercetin and their derivatives. The position of sugar moiety on flavonoid skeleton was not yet elucidated, except for the compounds for which reference standards were available.

Keywords: UHPLC-MS/MS, *Fragaria vesca*, phenolic compounds, product ion spectra, neutral loss scan

Zoznam použitých skratiek

APCI	- chemická ionizácia za atmosférického tlaku
API	- ionizácia za atmosférického tlaku
APPI	- fotoionizácia za atmosférického tlaku
B	- magnetický analyzátor
BEH	- hybridný sorbent
CID	- kolízne indukovaná disociácia
CV	- cone voltage – napätie vložené na vstupnom kuželi
ESI	- ionizácia elektrosprejom
GC	- plynová chromatografia
HPLC	- vysoko účinná kvapalinová chromatografia
HPT	- technológia hybridných častíc
HRMS	- hmotnostná spektrometria s vysokým rozlíšením
IT	- iónová pasca
KEM	- kaempferol
LC	- kvapalinová chromatografia
MALDI	- ionizácia laserom za účasti matrice
MS	- hmotnostná spektrometria
MS/MS	- tandemová hmotnostná spektrometria
NARP	- nevodná chromatografia na reverzných fázach
NL	- neutrálna strata
NMR	- nukleárna magnetická rezonancia
NPC	- chromatografia na normálnych fázach
LC	- kvapalinová chromatografia
OT	- orbitrap
PC	- papierová chromatografia
Q	- kvadrupól
QCE	- quercetín
QqQ	- trojitý kvadrupól
RIC	- rekonštruované iónové chromatogramy vybraných hmotností
R _p	- rozlišovacia schopnosť hmotnostného analyzátoru
RP	- chromatografia na reverzných fázach

SIM	- selektívny záznam iónu
SRM	- selektívny záznam iónových reakcií
TLC	- tenkovrstvá chromatografia
TOF	- analyzátor doby letu
UHPLC	- ultra-vysoko účinná kvapalinová chromatografia

Obsah

Zoznam použitých skratiek	6
1. Úvod.....	10
2. Cieľ a zadanie práce.....	12
3. Teoretická časť.....	14
3.1 Kvapalinová chromatografia	15
3.1.1 História LC	15
3.1.2 Van Deemterova rovnica	16
3.1.3 Chromatografické a separačné dáta	17
3.1.4 Gradientová elúcia	17
3.1.5 HPLC na reverznej fáze	18
3.1.6 Vzorky pre HPLC	19
3.1.7 Trendy HPLC.....	19
3.2 UHPLC.....	20
3.2.1 História UHPLC	20
3.2.2 UHPLC systém	20
3.2.3 Kolóny pre UHPLC	22
3.2.4 Klady a zápory UHPLC systému.....	24
3.3 Hmotnostná spektrometria	25
3.3.1 História MS.....	25
3.3.2 MS systém.....	26
3.3.3 Ionizácia.....	27
3.3.4 Hmotnostné analyzátory	29
3.3.5 Rozlišovacia schopnosť analyzátoru.....	30
3.3.6 Detektory	31
3.3.7 Tandemová hmotnostná spektrometria	31
3.3.8 Typy skenov MS, MS/MS	32

3.3.9	Výhody MS.....	34
3.4	Spojenie HPLC/MS.....	34
3.5	Analýza rastlinných extraktov.....	36
3.5.1	Fenolické látky.....	37
3.5.2	Metódy stanovenia fenolických látok.....	40
3.6	Jahoda obyčajná	43
3.7	Prehľad metód hodnotiacich obsahové látky <i>Fragaria sp.</i>	44
4.	Experimentálna časť	47
4.1	Použité chemikálie	48
4.2	Prístroje a vybavenie	49
4.3	Príprava mobilnej fázy, vzoriek a štandardov	49
4.4	Analytické podmienky	50
5.	Výsledky a diskusia	52
5.1	Optimalizácia podmienok pre UHPLC systém.....	53
5.2	Optimalizácia podmienok pre MS detektor	55
5.2.1	Optimalizácia MS/MS podmienok pre referenčné štandardy.....	55
5.3	Meranie spektier charakteristických zástupcov s využitím štandardov	57
5.4	Meranie vzorky	65
5.5	Skeny neutrálnych strát	88
5.5.1	NL referenčných štandardov.....	90
5.5.2	NL vzorky.....	94
5.6	Identifikované zlúčeniny	100
6.	Záver	104
7.	Použitá literatúra	107
8.	Prílohy.....	111

1. Úvod

Ultra-vysoko účinná kvapalinová chromatografia (UHPLC) je jednou z najdôležitejších moderných separačných techník v spojení s hmotnostnou spektrometriou (MS). Toto spojenie umožňuje separáciu a identifikáciu zložitých komplexných zmesí v jednej analýze. Prináša kombináciu výhod oboch techník ako je minimalizácia objemov vzoriek, výrazné skrátenie doby analýzy, vysoké rozlíšenie separácie a citlivosť.

UHPLC poskytuje v porovnaní s klasickou vysoko účinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) urýchlenie analýzy pri zachovanej, alebo zvýšenej kvalite separácie z hľadiska účinnosti a rozlíšenia, čo je umožnené zmenšením veľkosti častíc sorbentu pod 2 μm pri ultra-vysokých tlakoch.

Hmotnostná spektrometria je veľmi účinná analytická metóda charakterizovaná mimoriadne vysokou citlivosťou, účinnosťou a rýchlosťou.

Vývoj techník neustále vylepšuje tieto metódy a poskytuje nám stále lepšie možnosti v identifikácii zložitých zmesí látok. Metóda je obzvlášť výhodná pre vzorky z rastlinných extraktov. Rastlinné vzorky sú komplexné zmesi a ich separácia je náročná pre prítomnosť mnohých látok v rôznych koncentráciách a izomérnych formách.

Medzi hlavné skupiny fenolických látok obsiahnutých v listoch jahody obyčajnej (*Fragaria vesca* L.) patria: fenolické kyseliny, flavonoly (deriváty kaempferolu a quercetínu), deriváty kyseliny galovej a ellagovej a ellagitaníny.

2. Cieľ a zadanie práce

Diplomová práca sa zaoberala separáciou a identifikáciou fenolických látok za pomoci metódy UHPLC-MS/MS v rastlinnom extrakte z jahody obyčajnej. Identifikácia bola zameraná predovšetkým na flavonoidy a im príbuzné látky. Vyhodnotenie kvalitatívneho zloženia obsahových látok bolo založené na porovnaní a vyhodnotení rôznych typov MS a MS/MS skenov v ESI pozitívnom aj negatívnom móde detekcie. Využité boli základné skeny, skeny neutrálnych strát, skeny produktových iónov a rekonštruované iónové chromatogramy vybraných hmotností (RIC).

Cieľom práce bola identifikácia obsahových látok zo suchého lyofilizovaného vodného extraktu z listov *Fragaria vesca* L.

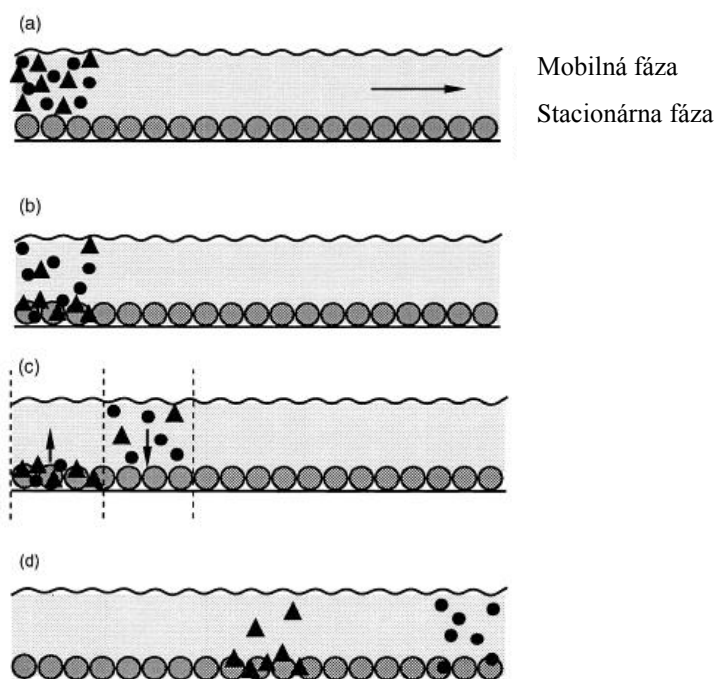
Prvou úlohou bola optimalizácia podmienok separácie pre UHPLC systém. Ako druhá úloha bola optimalizácia podmienok pre MS detektor. Treťou úlohou bolo prevedenie MS experimentov. Štvrtou úlohou bolo nameranie MS/MS experimentov a nameranie skenov neutrálnych strát. A ako piata úloha bolo porovnanie získaných dát s nameranými dátami referenčných štandardov a ďalšia interpretácia dát.

3. Teoretická část

3.1 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia (LC) je inštrumentálna separačná technika. Založená je na rozdielnej distribúcii látok medzi dvoma navzájom nemiešateľnými fázami. Mobilnú fázu tvorí kvapalina, ktorá pod vysokým tlakom prestupuje chromatografickou kolónou naplnenou stacionárnou fázou (Obr. 1) [1 - 4].

Obr. 1: Postup chromatografickej separácie



3.1.1 História LC

Chromatografia ako fyzikálno-chemická metóda separácie komplexných zmesí bola vyvinutá začiatkom dvadsiateho storočia ruskotaliankym botanikom M. S. Tswetom. Vo svojej práci „O novej forme adsorpčného javu a jeho použitie v biochemickej analýze“ v roku 1903 popísal novoobjavený fenomén separácie komplexných zmesí založenej na adsorpcii, ktorú neskôr nazval chromatografia. V čase svojho vývoja chromatografická metóda nebola medzi vedcami uznávaná. O 25 rokov neskôr v roku 1931 publikovali Lederer spolu s Kuhnenom a Wintersteinom prácu o čistení xantofylov na CaCO_3 adsorpčnej kolóne podľa procedúry popísanej M. S. Tswetom [4].

V roku 1941 A. J. P. Martin a R. L. M. Synge z Cambridgeskej univerzity objavili rozdeľovaciu chromatografiu, za čo získali Nobelovu cenu. Čoskoro na to nasledoval rýchly rozvoj chromatografických techník [4].

Tswet vynášiel chromatografiu vo forme kvapalina-pevná fáza, ale jej vývoj pokračoval po viac ako 50 rokoch, primárne vo forme plynovej chromatografie a čiastočne ako tenkovrstvá a liquid-liquid (kvapalinovo-kvapalinová) chromatografia. Znovuobjavenie LC v jej modernej podobe a jej enormne rýchly rozvoj z nej urobil dominantnú analytickú techniku dvadsiateho prvého storočia. Základ pre vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu (HPLC) postavil Prof. Horvath. O niečo neskôr v roku 2001 definoval význam slova „účinnosť“ ako „súhrn parametrov efektivity“ [4].

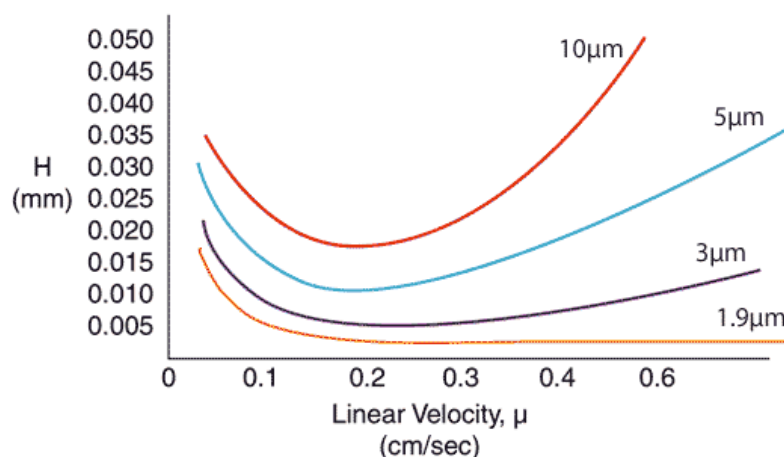
LC sa ukázala byť za posledných 30 rokov jednou z najviac používaných technológií v laboratóriách po celom svete. Prvoradé pre rast tejto techniky bol vývoj materiálov stacionárnej fázy používaných na efektívnu separáciu. Základné princípy tohto vývoja sa riadia van Deemterovou rovnicou. Je to empirický vzorec, ktorý popisuje vzťah medzi lineárnou prietokovou rýchlosťou a účinnosťou [5].

3.1.2 Van Deemterova rovnica

$$H = H_F + H_L + H_M$$

Kde H je výškový ekvivalent teoretickej priehradky. H_F je prírastok vírovej difúzie k H , H_L je prírastok pozdĺžnej molekulárnej difúzie k H a H_M prírastok odporu proti prevodu hmoty analytu k H . Nízke hodnoty výšky teoretického priehradky predstavujú vyššiu separačnú účinnosť [6 - 8]

Obr. 2: Ukážka Van Deemterových kriviek pre častice 10 μ m až 1,9 μ m [9]



Z Obr. 2 vyplýva, že čím menšie sú častice, tým nižšia je výška teoretickej priehradky a vyššia separačná účinnosť [4].

J.J. van Deemter teda zistil, že účinnosť kolóny je možné zlepšiť zmenšením veľkosti častíc stacionárnej fázy [6]. Zvýšenie rozlíšenia a rýchlosti analýzy umožnené zmenšením veľkosti častíc viedlo k trendu používania menších častíc v kratších kolónach. Kolóny naplnené časticami pod 2 μm však predstavujú problém pre tlakové možnosti bežných HPLC technológií, ktoré pracujú do asi 400 bar. Priamočiarym prístupom k využitiu výhod častíc pod 2 μm je vyvinutie prístroja schopného dosiahnuť nutných tlakov (cca 1000 bar) [4].

3.1.3 Chromatografické a separačné dáta

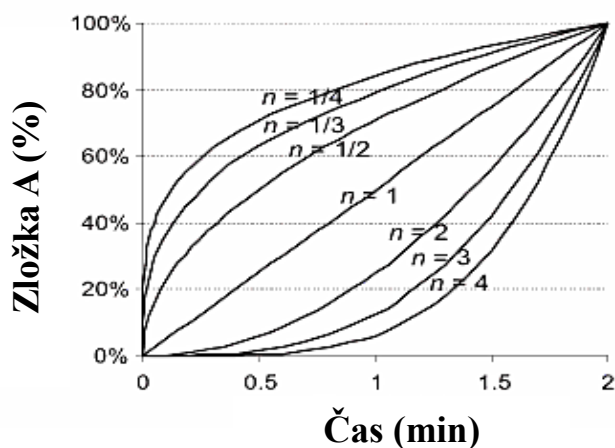
Charakteristickou veličinou každej analyzovanej látky v chromatografickom systéme je retenčný čas (t_R), ktorý predstavuje dobu od nástreku po maximum píku analytu [2, 3].

3.1.4 Gradientová elúcia

Gradientová elúcia je často používanější a účinná technika zmeny selektivity separácie HPLC, pri ktorej sa zloženie mobilnej fázy mení s časom. Najčastejšie sa pracuje s binárnou elúciou. Časovú zmenu koncentrácie v priebehu separácie označujeme ako profil gradientu [6, 7].

Gradientový priebeh je charakterizovaný gradientovými krivkami (Obr. 3) [6].

Obr. 3: Ukážka gradientových kriviek [1]



Gradienty môžeme rozdeliť na stupňové a spojité (lineárne, logaritmické a exponenciálne). Spojitý gradient charakterizujú tri nezávislé parametre : počiatočná koncentrácia elučnej zložky mobilnej fázy, strmosť gradientu a tvar gradientu. Pri analýze na chemicky viazaných nepolárnych fázach sa najčastejšie využíva gradient methanolu alebo acetonitrilu vo vode [6, 7].

Gradientová elúcia je technika, ktorá sa s výhodou využíva pri analýze zložitých zmesí (obzvlášť pre extrakty z rastlín), kde nie je možné pracovať len s jedným eluentom, pretože by mohlo dochádzať k neúplnému rozdeleniu zložiek a k predĺženiu doby analýzy [10, 11].

Výhody gradientovej analýzy:

- Lepšie rozlíšenie skoro a neskoro eluovaných pík
- Lepšia citlivosť pri neskoro eluovaných píkoch
- Je vhodnejšia pre komplexné vzorky a metódy, ktoré vyžadujú kvantifikáciu všetkých pík
- Vyššia kapacita separácie [10].

3.1.5 HPLC na reverznej fáze

HPLC na reverznej fáze je mód, v ktorom je v porovnaní s HPLC na normálnej fáze stacionárna fáza nepolárna a mobilná fáza je polárna [1].

Najobľúbenejšou metódou používanou pre viac ako 50 % separácií je reverzná HPLC na silikagely modifikovanom C₁₈ ligantom. Analyty sú eluované zo stacionárnej fázy v závislosti na svojej hydrofóbnosti. Polárne zlúčeniny sú teda eluované rýchlejšie ako nepolárne. Čím je vyššia hydrofóbnosť povrchu stacionárnej fázy, tým dlhšie sú retenčné časy analytu. Väzba skupín s donor-elektrónovými vlastnosťami na stacionárnej fáze vedie k výraznejšej retencii zlúčenín obsahujúcich dipóly [1, 10].

Mobilnú fázu tvoria polárne rozpúšťadlá: voda (často s prídavkom kyseliny, alebo bázy, ktoré sú potrebné pre ionizovateľné látky), typické pre HPLC na reverznej fáze sú organické rozpúšťadlá (methanol, isopropanol, acetonitril a iné) a ich zmesi [1].

Organické rozpúšťadlá (acetonitril, methanol a iné) sú obvykle používané ako organické modifikátory. Zvýšením koncentrácie organických modifikátorov sa znížia celkové retenčné časy, ale zmenia sa aj retenčné časy v závislosti na vlastnostiach vzorky [10].

Všeobecný vzťah medzi typom rozpustenej látky a jeho retenciou môže byť odhadnutý porovnaním retenčných faktorov sady štandardov s ich rozdeľovacím koeficientom voda/oktanol, teda ich hodnôt $\log P$, ako meradla ich relatívnej rozpustnosti vo vode [10].

Elučné správanie aromatických a alifatických zlúčenín je často odlišné v rozpúšťadlách obsahujúcich rôzne organické modifikátory. Rozdiely sú spôsobené rozdielnou rozpustnosťou analytu v organických rozpúšťadlách [1, 10].

3.1.6 Vzorky pre HPLC

Napriek tomu, že mnoho organických zlúčenín má len obmedzenú rozpustnosť vo vodnej mobilnej fáze, nie je to v praxi limitujúce, pretože len malé množstvo vzorky je obvykle nastreknuté. Ak je rozpustnosť vzorky vo vodnej mobilnej fáze nízka, je preferovaná chromatografia na normálnej fáze (NPC). Podobne i vzorky, ktoré sú nestále vo vodnom prostredí môžu byť separované pomocou NPC s použitím nevodných rozpúšťadiel [10].

Nevodná reverzná HPLC (NARP) je rezervovaná pre veľmi hydrofóbne vzorky, ktoré sa eluujú neskoro alebo nie sú eluované 100% acetonitrilom (napr. lipidy). Mobilnou fázou pre NARP separácie je zmes polárnejšieho a menej polárneho organického rozpúšťadla. Polárnejšou zložkou mobilnej fázy je často acetonitril alebo methanol. Menej polárnou zložkou môže byť chloroform, tetrahydrofuran, acetón [10].

Chromatografia na reverznej fáze (RP) je metódou voľby pre väčšinu rastlinných vzoriek. Je vhodnejšia ako ostatné formy HPLC a je pri nej vyššia pravdepodobnosť, že povedie k požadovanej finálnej separácii. Kolóny s reverznou fázou sú efektívne a stabilné. Takto získané výsledky sú ľahšie reprodukovateľné [10].

3.1.7 Trendy HPLC

Súčasný trendy v oblasti vysokoúčinné kvapalinovej chromatografie sú:

- skracovanie kolón a kolóny s menším vnútorným priemerom,
- zmenšovanie veľkosti častíc sorbentu,
- využitie ultra-vysokých tlakov (15000 psi/ 1000 bar/ 100 MPa),
- stále rastúci význam spojenia techník LC-MS,

- komplexná miniaturizácia separačného systému,
- dôraz na automatizáciu analýzy [7, 12].

3.2 UHPLC

Ultra-vysoko účinná kvapalinová chromatografia je relatívne novšia, účinná separačná varianta kvapalinovej chromatografie. Separačný proces je založený na využití malej veľkosti častíc sorbentu (pod $2\mu\text{m}$) pri ultra-vysokom tlaku (až do 1300 barov), čo poskytuje dobrú separačnú účinnosť a vysokú priepustnosť vzorky [1, 2, 12].

3.2.1 História UHPLC

V roku 1997 laboratórium J. Jorgensona skonštruovali ultra-vysoko účinnú kvapalinovú chromatografiu (UHPLC). Použili dlhú (nad 50 cm) silikagelovú kapilárnu kolónu plnenú $1,5\mu\text{m}$ neporéznymi časticami reverzného silikagelu a tlak vo výške až 4100 bar. Bolo predvedené obrovské zvýšenie účinnosti oproti bežným kolónam, čo vznetilo veľký záujem o túto techniku [4].

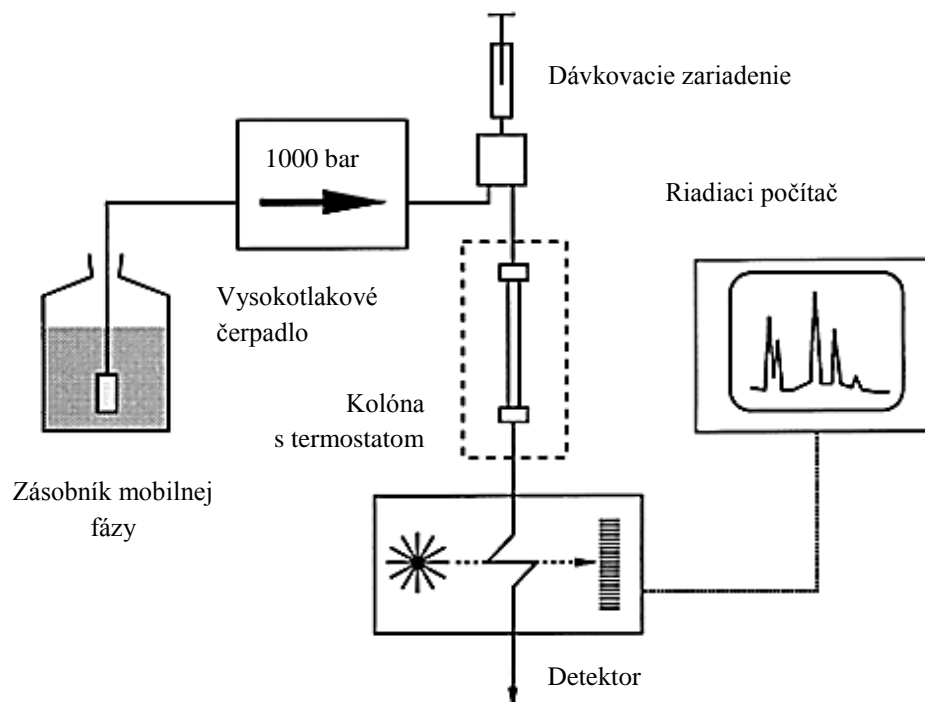
Praktické problémy a limitácie techniky ju obmedzil na použitie vo výskumných zariadeniach. Avšak nedávne vyriešenie technickej realizácie a uvedenie prvého komerčne dostupného prístroju v roku 2004 sú kroky, ktoré z UHPLC činia nástroj dnešnej farmaceutickej analýzy [4].

3.2.2 UHPLC systém

Skladá sa zo zásobníka mobilnej fázy, vysokotlakového čerpadla, dávkovacieho zariadenia, predkolóny, kolóny, detektora a riadiaceho počítača (Obr. 4) [1, 13].

Všetky tieto časti boli popísané vo viacerých publikáciách, preto ďalej popíšem len časti, ktoré sú významné pre UHPLC metódu.

Obr. 4: Bloková schéma UHPLC systému [2]



Vysokotlakové čerpadlo

Mobilná fáza je do UHPLC systému poháňaná pomocou vysokotlakového čerpadla, schopného vyvíjať ultra-vysoký tlak (až 1300 bar), ktoré dodáva rovnomerný prúd rozpúšťadla v zadanej prietokovej rýchlosti [9, 13]. Vysoký tlak je kľúčový vzhľadom k náplni kolón, ktorá je tvorená malými časticami, a k značnej viskozite mobilnej fázy. Následkom sú vysoké nároky na výkonnosť a kvalitu čerpadla, na tesnosť spojov a kolóny. Zabezpečenie dokonalej plynulosti toku mobilnej fázy je dôležité pre detekciu kvôli zamedzeniu šumu v odozve detektora [2, 13].

Najpoužívanejšie je piestové čerpadlo. Poskytovaný výber so štyroch rozpúšťadiel je veľkou výhodou pre tvorbu gradientovej elúcie. Umožňuje jednoduchú automatizáciu, ľahkú výmenu rozpúšťadiel a prepínanie metód. Na konci čerpadla sa nachádza degasser, ktorý odstraňuje plyn z rozpúšťadla [1, 9].

Niektoré komerčne dostupné UHPLC systémy sú limitované na rýchlosť toku ≤ 5 ml/min, preto sa obvykle používajú kolóny s menším priemerom pre umožnenie vysokej lineárnej rýchlosti mobilnej fázy pre rýchlu separáciu [14].

3.2.3 Kolóny pre UHPLC

Chromatografické separácie sú založené na povrchových interakciách sorbentu a analytu. Moderní sorbenty sú malé porézne častice alebo monolity s veľkou plochou povrchu. Väčšina analytických kolón je založená na báze silikagélu, ktorý má dobré chromatografické a mechanické vlastnosti. Dostupné sú aj ďalšie stacionárne fázy na bázy oxidu hlinitého, oxidu zirkoničitého či organických polymérov [2, 4, 15].

Všeobecne používané sorbenty pre HPLC sa delia na anorganický (silikagél) a organický typ (polymér, uhlík). V UHPLC sú využívané sorbenty typu silikagélu, hybridné sorbenty a niektoré povrchovo porézne častice.

- Sorbenty založené na silikagéle sú mechanicky odolné a vykazujú vysokú účinnosť. Ich nevýhodou je limitovaný rozsah pH mobilní fázy a chemická nestabilita.
- Hybrid Particle Technology (technológia hybridných častíc, HPT) spája výhody vlastností oboch základných typov sorbentov (organický a anorganický) pre dosiahnutie optimálnych vlastností sorbentu. Sorbent má vynikajúcu mechanickú pevnosť, výbornú separačnú účinnosť a je stabilný v širokom rozmedzí pH.
- Ethylene-Bridged Hybrids (BEH technológia) je druhou generáciou hybridných sorbentov. Podobne ako HPT, aj BEH technológia spojila organický (polymér, uhlík) a anorganický (silikagél) typ sorbentu, čím dosiahla optimálne vlastnosti sorbentu. Niektoré druhy stacionárnej fázy typu BEH sú na ukážku uvedené na Obr. 5 [9]. BEH technológia využíva v štruktúre ethylénové mostíky (Obr. 6). Kombináciou silikagélu a ethylénových mostíkov sa podarilo vyrobiť materiál vynikajúcej mechanickej pevnosti, vysokej odolnosti voči širokej škále pH (1-12) a s mimoriadnou separačnou účinnosťou.
- Technológia s pevným jadrom a poréznym povrchom. Častice s pevným jadrom nie je úplne porézna. Vyrábané sú pomocou techniky koloidných roztokov a technológie usporiadania nanočastíc, ktoré vytvoria homogénny porézny obal na pevnom jadre silikagélu. Výsledkom je kolóna s vysokým počtom teoretických priehradok [1, 9, 10, 12, 15, 16].

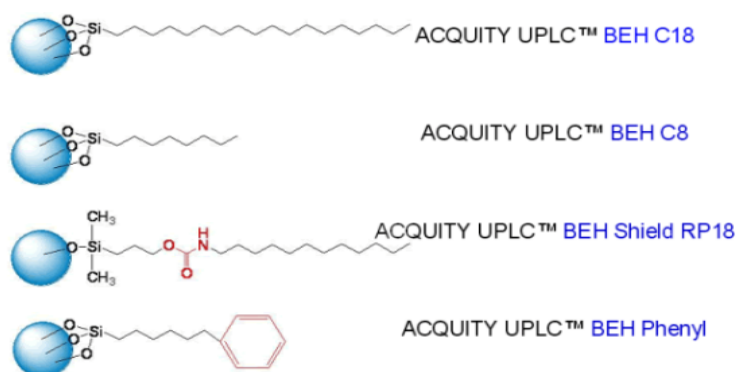
Obr. 5: Typy stacionárnej fázy typu BEH v Acquity UPLC kolónach

1. C18

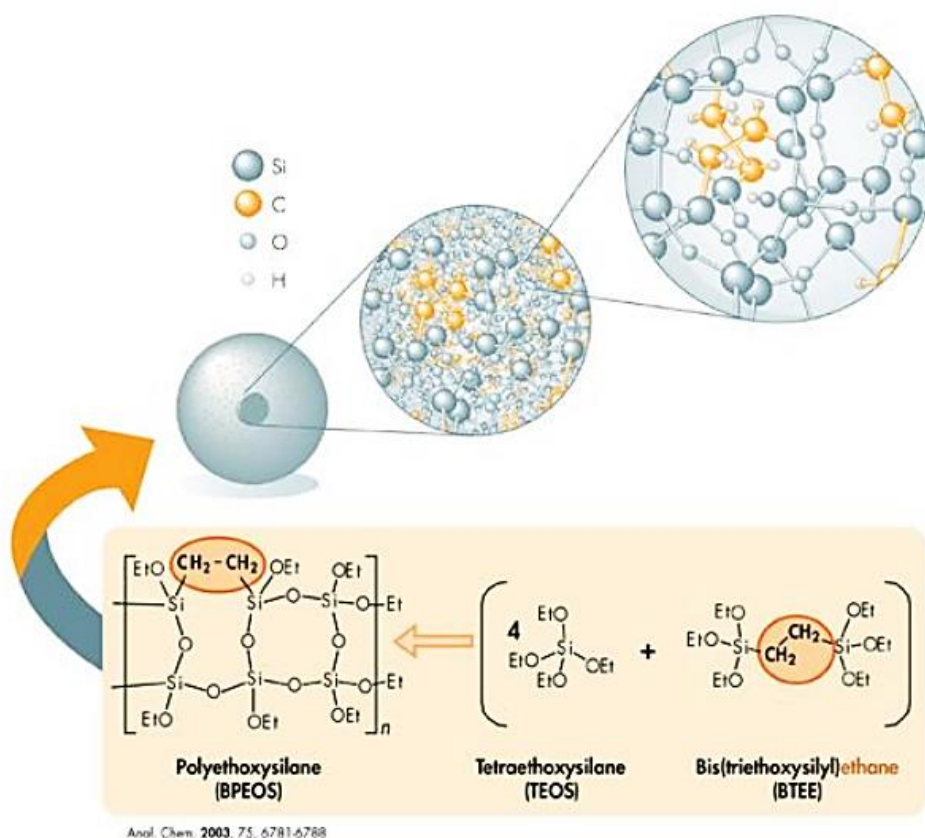
2. C8

3. polárna skupina(karbamát)

4. fenylová skupina



Obr. 6: BEH náplň UHPLC kolón: ethylenové mostíky v matrici silikagélu [9]



Podľa typu ligandov pripojených na povrch má stacionárna fáza rôzny charakter:

- polárny (-OH, -NH₂, -CN, -NO₂, polyethylenglykol), využívajú sa v chromatografii na normálnej fáze,
- nepolárny (-C8, -C18, fenylyl, amid atd.), používajú sa v chromatografii na reverznej fáze,
- stredne polárny (-CN, -NH₂), použiteľné pre oba typy chromatografií,

- iónový charakter (NH_4^+ , $-\text{COO}^-$), výhodné pre iontovýmennú chromatografiu [9, 10, 12, 16].

Chromatografia na reverzných fázach so sorbentom s postrannými ligandami C18 a C8 je dnes najviac zastúpenou stacionárnou fázou pre UHPLC. Technológia výroby analytických kolón sa stále zlepšuje a vyvíja, a tak poskytuje sorbenty s odlišnými vlastnosťami, napríklad s odlišnou selektivitou v porovnaní s C18 modifikovanými stacionárnymi fázami, ktoré sú výhodnejšie pre určité typy vzoriek [1, 9, 10, 12, 16].

Chromatografické analytické kolóny pre UHPLC sú krátke (50 – 100 mm) s vnútorným priemerom 2,1 mm, plnené sorbentom o malom priemere pod 2 μm , najčastejšie o veľkosti 1,5 - 1,9 μm . Tieto najčastejšie hybridné častice pracujú pri vysokom tlaku (cez 1000 bar), vynikajú svojou mechanickou odolnosťou a výbornou separačnou účinnosťou. Plnenie kolón časticami menšími než 2 μm umožňuje skrátenie kolóny, a tak i doby analýzy pri zachovanej účinnosti a rozlíšení, pretože sa zvýši počet teoretických priehradok na hodnoty okolo 180 000/m [1, 4, 15, 17]. Konštrukcia kolón umožňuje optimálnu kompatibilitu s MS prietokovou rýchlosťou [6, 17].

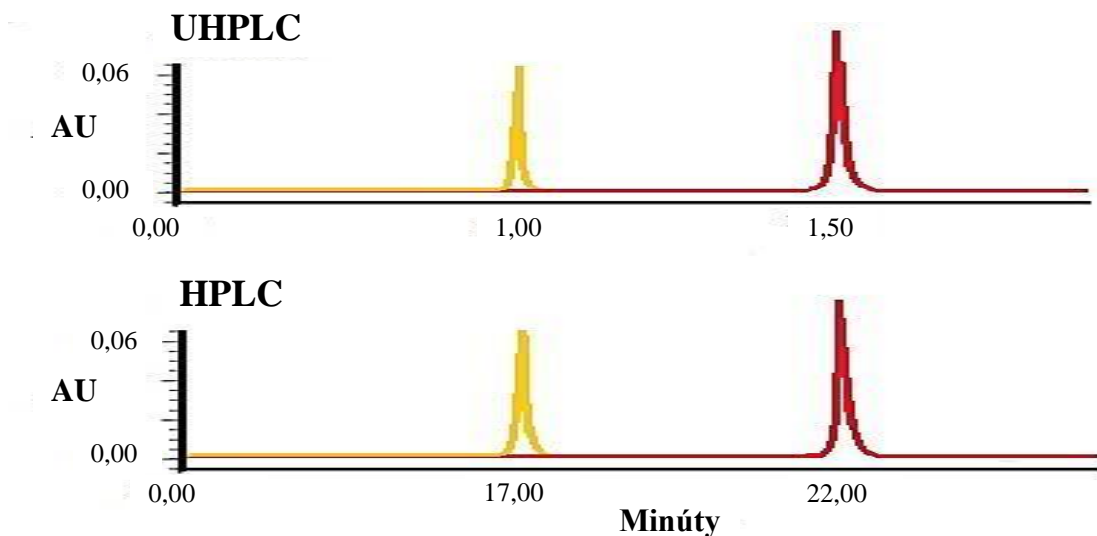
3.2.4 Klady a zápory UHPLC systému

Systém UHPLC poskytuje mnohé výhody v porovnaní s klasickým HPLC:

- menší objem vzoriek
- menší objem mobilnej fázy (výhoda s ekonomického aj ekologického hľadiska)
- veľmi krátky čas separácie (do 10 minút)
- malé častice odolávajú vysokým tlakom (nad 1000 bar)
- zvýšená citlivosť
- zvýšené rozlíšenie a separačná účinnosť
- viac kvalitatívnych informácií
- širší rozsah lineárnych rýchlostí a prietoku bez straty účinnosti [5, 9, 17, 18].

Obr. 7 zobrazuje porovnanie dĺžky separácie štandardným HPLC systémom a systémom UHPLC [12].

Obr. 7: Porovnanie separácií pomocou HPLC a UHPLC systému



Nevýhodou je vysoká obstarávacía cena systému ako aj vysoká cena UHPLC kolón [16].

3.3 Hmotnostná spektrometria

MS je fyzikálno-chemická analytická metóda založená na meraní hodnôt pomeru hmotnosti a nábojového čísla (m/z). Umožňuje určenie molekulárnej hmotnosti jednotlivých molekúl a atómov na základe ich prevedenia na nabité ióny [19 – 21]. Ióny produkované v iónovom zdroji sa urýchľujú a následne separujú a detegujú [3].

MS nie je skutočnou spektrálnou technikou, pretože spektrálne techniky merajú rozdiel energií medzi dvoma energetickými stavmi molekuly. MS namiesto toho stanovuje množstvo iónov [20, 22, 23]. Je to mimoriadne citlivá a deštruktívna metóda s minimálnou spotrebou vzorky poskytujúca údaje o molekulovej hmotnosti a iné informácie o štruktúre molekuly [20].

3.3.1 História MS

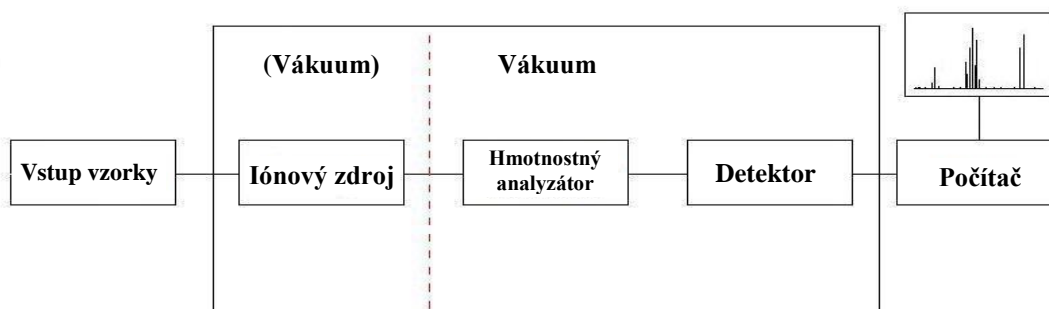
J.J. Thomson v roku 1913 rozdelil izotopy neónu pomocou tzv. parabolového spektrografu. Je považovaný za zakladateľa hmotnostnej spektrometrie. Počas 40. rokov minulého storočia sa MS rozšírila v oblasti priemyslu. Analýza mala povahu „odtlačku palca“ bez interpretácie spektier. V roku 1957 prebehol prvý pokus o spojenie plynovej chromatografie a MS [20, 24].

O skoro 20 rokov neskôr sa McLafferty a Baldwin pokúsili o spojenie HPLC/MS. Za posledných 50 rokov prešla MS veľkými zmenami: vynali sa mäkké ionizačné techniky, dochádza k miniaturizácii prístrojov atď. Niekoľko vedcov získalo pri vývoji MS Nobelovej ceny za chémiu alebo fyziku (F.W Aston, W.Paul, J.B. Fenn, K. Tanaka) [20, 24].

3.3.2 MS systém

Každý hmotnostný spektrometer obsahuje tieto základné funkčné časti: vstup vzorky, iónový zdroj, hmotnostný analyzátor, detektor a počítač (Obr. 8) [20, 23].

Obr. 8: Bloková schéma hmotnostného spektrometra



Iónový zdroj sa používa na prevedenie analyzovanej látky do ionizovaného stavu. Hmotnostný analyzátor slúži na rozdelenie zmesi iónov s rôznymi molekulovými hmotnosťami. Detektor, na ktorý je nasmerovaný prúd iónov, poskytuje signál odpovedajúci počtu dopadajúcich iónov. Tento signál sa po digitalizácii prevedie do počítača s adekvátnym programovým vybavením a spracuje sa do podoby hmotnostného spektra [23, 25].

Nenahradiťelný pre fungovanie systému je vákuový systém, ktorý zabezpečuje udržiavanie dostatočného vákua. Vákuum je získané pomocou vákuových púmp [20].

Ako hmotnostné spektrum označujeme zápis pomerného zastúpenia rôznych druhov rozdelených iónov, charakterizovaných pomerom hmotnosti a náboja [19, 23]. Rozlišujeme tri typy grafického vyjadrenia iónového signálu: kontinuálne profilové spektrum, čiarové spektrum a tabuľkový výpis [20]. Väčšina vyhodnocovacích programov hmotnostných spektier zobrazuje píky graficky v kontinuálnej forme [23].

3.3.3 Ionizácia

MS nám poskytuje informácie týkajúce sa výhradne nabitých častíc, preto je ionizácia skúmanej látky nevyhnutnou podmienkou analýzy [23]. Hmotnostný spektrometer nie je schopný detegovať neutrálne molekuly. Dôvod je to, že nabité molekuly môžu byť ovládané pomocou elektrických či magnetických polí, na rozdiel od elektricky neutrálnych molekúl, ktoré na ne nereagujú [26].

Podľa množstva dodanej ionizačnej energie rozdeľujeme ionizačné techniky na mäkké (kde dodaný prebytok energie je malý a preto aj pravdepodobnosť fragmentácie) a tvrdé (kde dodaný prebytok postačuje k rozsiahlej fragmentácii primárneho iónu) [23].

Ionizačné techniky využívané pri HPLC patria k mäkkým technikám, ktoré pracujú za atmosférického tlaku (API):

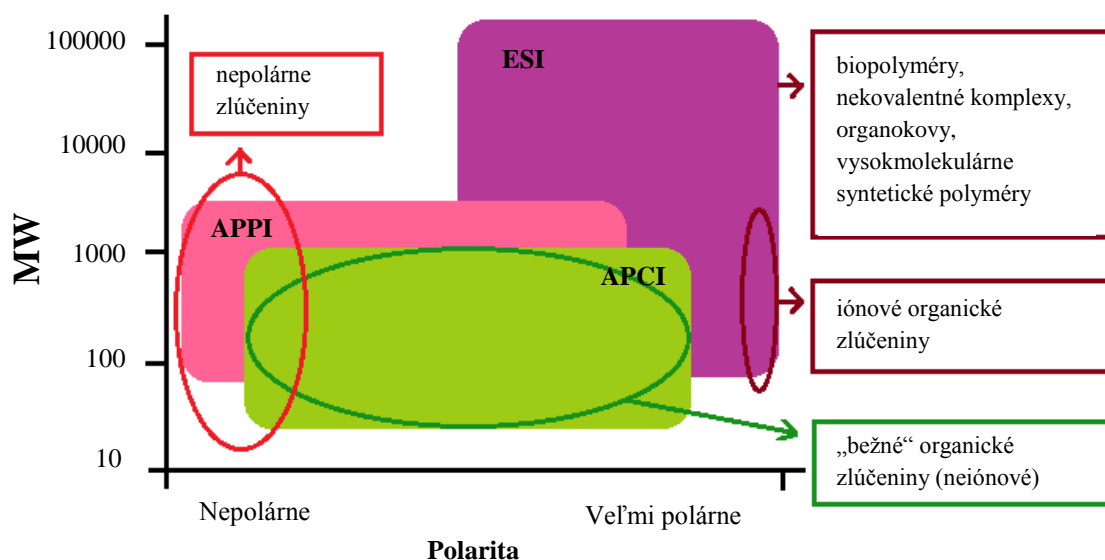
- ESI - ionizácia elektrosprejom
- APCI - chemická ionizácia za atmosférického tlaku
- APPI - fotoionizácia za atmosférického tlaku
- MALDI - ionizácia laserom za účasti matrice [20].

API techniky boli vyvinuté s cieľom zlepšiť účinnosť ionizačného procesu v spojení LC/MS, kde je potrebný prechod medzi kvapalnou a plynnou fázou [27]. Na Obr. 9 sú uvedené najvhodnejšie ionizačné techniky pre spojenie LC/MS v závislosti na molekulovej hmotnosti a polarite skúšanej látky [20].

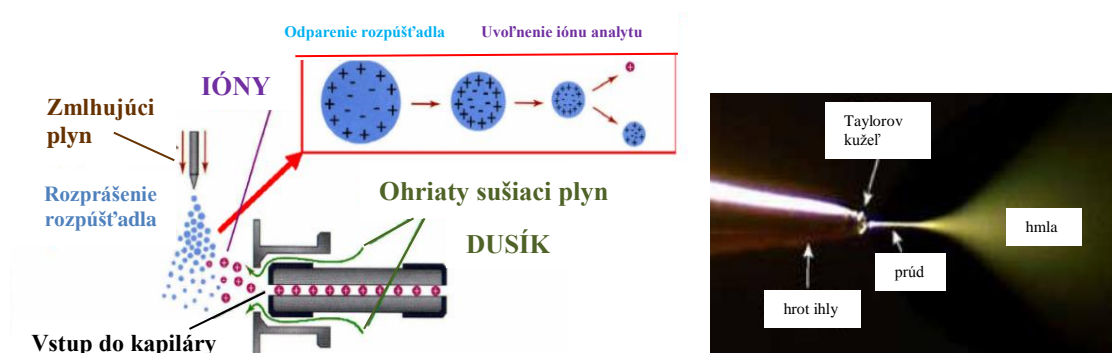
ESI je mäkká ionizačná technika vhodná pre vysoko labilné a neprchavé polárne zlúčeniny. Je jednou z najpoužívanějších techník [19, 20]. ESI je založená na generovaní iónov priamo z roztoku vytvorením hmly nabitých mikrokvapôčok v prítomnosti vysokého elektrostatického poľa (2 - 4 kV) [20, 28]. Pôsobenie elektrostatického poľa vyvoláva na výstupe z kapiláry deformáciu kvapaliny do kužeľovitého tvaru tzv. Taylorov kužeľ [24]. Po rozprášení pomocou zmlhujúceho plynu (N_2) vzniknuté kvapôčky nesú na povrchu veľké množstvo nábojov. S klesajúcou veľkosťou kvapôčky pri vysušaní desolvatačným plynom (N_2) ešte vzrastá hustota elektrického náboja. Vzájomná repulzia rovnakých nábojov na povrchu presiahne kritické hodnoty sily povrchového napätia a dochádza k tzv. Coulombickej explózii, pri ktorej jednotlivé ióny postupne opustia kvapôčku. Takto vzniknuté ióny sú ďalej elektrostaticky smerované do hmotnostného analyzátoru (Obr. 10) [19, 20, 29].

Je potrebný transport z atmosférického tlaku do oblasti vysokého vákua, v ktorom prebiehajú ostatné fázy analýzy. Tento prechod prebieha najčastejšie trojfázovo (1. ,2. a 3. stupeň vákua). Kladný náboj v ESI získa častica v roztoku nadbytočnými protónmi či inými kationmi. Nabíjanie záporných iónov sa najčastejšie prevádza odtrhnutím protónu [19, 20, 29].

Obr. 9: Voľba ionizačnej techniky



Obr. 10: Schéma a fotografia ionizácie elektrosprejom [30]



Úspech ESI začal, keď Fenn a kolektív dokázali, že z proteínov boli získané viacnásobne nabité ióny, čo umožňuje stanovenie ich molekulovej hmotnosti na prístrojoch, ktorých hmotnostný rozsah je limitovaný. Na začiatku bola ESI považovaná za ionizačný zdroj určený k analýze bielkovín. Neskôr bolo jej použitie rozšírené nielen na iné polyméry a biopolyméry, ale aj na analýzu malých polárnych molekúl [31].

Citlivosť ESI je funkciou koncentrácie nastreknutej vzorky [32]. ESI umožňuje veľmi citlivé analýzy malých, veľkých i labilných molekúl. Výhodou techniky ESI-MS je tvorba iónov priamo z roztoku, čo predurčuje túto techniku ako výhodný detektor pre HPLC [19, 29].

3.3.4 Hmotnostné analyzátory

Vzniknuté ióny sa delia v plynnej fáze za vysokého vákua v analyzátoroch, ktoré fungujú na princípe vzťahu nabitých častíc k magnetickému poľu alebo sa rozlíšenie uskutočňuje podľa kinetickej energie [19, 23].

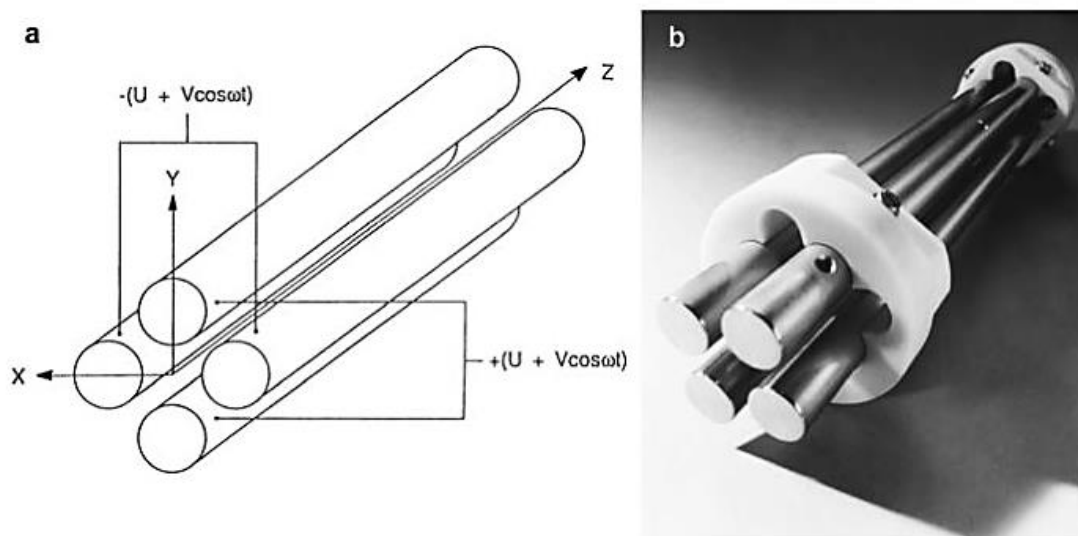
Rozdelenie jednotlivých princípov separácie iónov na základe pomerov m/z je popísané v Tabuľka 1. [31, 33].

Tabuľka 1.: Princípy separácie iónov na základe pomerov m/z

Analyzátor	Symbol	Princíp separácie
Magnetický	B	zakrivením dráhy letu iónu v magnetickom poli- kinetická energia
Kvadrupólový	Q	rôzna osciláciou iónov v kombinácii jednosmerného a vysokofrekvenčného striedavého napätia
Iónová pasca	IT	rezonančná frekvencia
Analyzátor doby letu	TOF	rôznou dobou letu iónu
Orbitrap	OT	rôznou frekvenciou harmonických oscilácií

Kvadrupólový analyzátor je založený na separácii iónov pohybujúcich sa v elektrickom poli účinkom jednosmerného a striedavého napätia. Samotný poskytuje nízke rozlíšenie. Konštrukčne ide o štyri kovové tyče usporiadané rovnobežne, ktoré sú dve a dve pripojené k zdrojom jednosmerného a striedavého napätia (Obr. 11). Táto kombinácia napätia vytvára hmotnostné filtre pre ióny. V daný okamžik sú oscilácie stabilné len pre určitú hodnotu m/z a tento ión prejde kvadrupólovým analyzátorom. Ióny s odlišnými hodnotami pomeru m/z majú nestabilné oscilácie a sú zachytené na tyčiac kvadrupólu. Hmotnostné spektrum sa meria tak, že sa súčasne zvyšuje jednosmerné aj striedavé napätie, pričom ich pomer zostáva konštantný, tak sú postupne prepustené na detektor všetky ióny [20, 23]. Kvadrupólové analyzátory sú populárne, pretože sú kompaktné, relatívne lacné a na prevádzku postačujú malé skúsenosti [34].

Obr. 11: Kvadrupólový analyzátor (a- schéma, b- fotografia) [33]



Trendom v rozvoji hmotnostného analyzátoru je kombinácia rôznych analyzátorov následne po sebe aby sa zvýšila ich využiteľnosť [31].

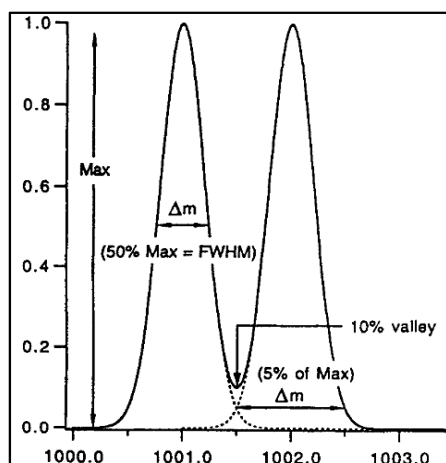
3.3.5 Rozlišovacia schopnosť analyzátoru

Rozlišovacia schopnosť (R_P) analyzátoru je vyjadrenie miery schopnosti hmotnostného analyzátoru rozlíšiť blízke hodnoty m/z , tzn. najmenší rozdiel, ktorý vedia zachytiť (Obr. 12) [12, 20, 30].

R_P môžeme definovať dvoma spôsobmi:

1. definícia založená na šírke jedného píku (m): $R_P = m / \Delta m$
2. definícia založená na prekrytí dvoch píkov: $R_P = m_1 / (m_2 - m_1)$

Obr. 12: Rozlišovacia schopnosť analyzátoru [12]



3.3.6 Detektory

Detegovanie iónov prebieha na základe ich náboja, hmotnosti alebo rýchlosti [35]. Najčastejšie detektory používané v MS sú [20, 31]:

- elektrónový násobič
- fotonásobič
- Faradayova klieť

3.3.7 Tandemová hmotnostná spektrometria

Mäkké ionizačné techniky pri ionizácii neposkytujú dostatočnú štruktúrnú informáciu, a preto bolo nutné túto informáciu získať pomocou MS/MS experimentov [19, 23].

V MS/MS usporiadaní sa vybraný ión podrobí kolíznej aktivácii pri kolízne indukovanej disociácii (CID), čím dôjde k jeho rozpadu na fragmentované ióny. Následne sa zmeria spektrum týchto fragmentov. Uvedený proces je zjednodušene rozdelený do troch krokov: izolácia, fragmentácia a detekcia iónov. MS/MS spektrum obsahuje len fragmentové ióny vzniknuté rozpadom daného prekursoru a žiadne nečistoty [20, 31].

Najšetrnejšou a najpoužívanejšou MS/MS konfiguráciou je trojitý kvadrupól, kde je analýza hmotností robená v prvom a treťom kvadrupóle. Druhý kvadrupól slúži ako kolízna cela, ktorá udržiava ióny v smere letu a efektívne predlžuje ich dráhu [19]. Trojitý kvadrupól (QqQ) ako tandemový hmotnostný analyzátor je dominantný v kvantitatívnej analýze. QqQ poskytuje najmenej 20-krát vyššiu citlivosť v porovnaní s ostatnými hmotnostnými analyzátormi, lepšiu lineárnu dynamickú rozsah a opakovateľnosť [36].

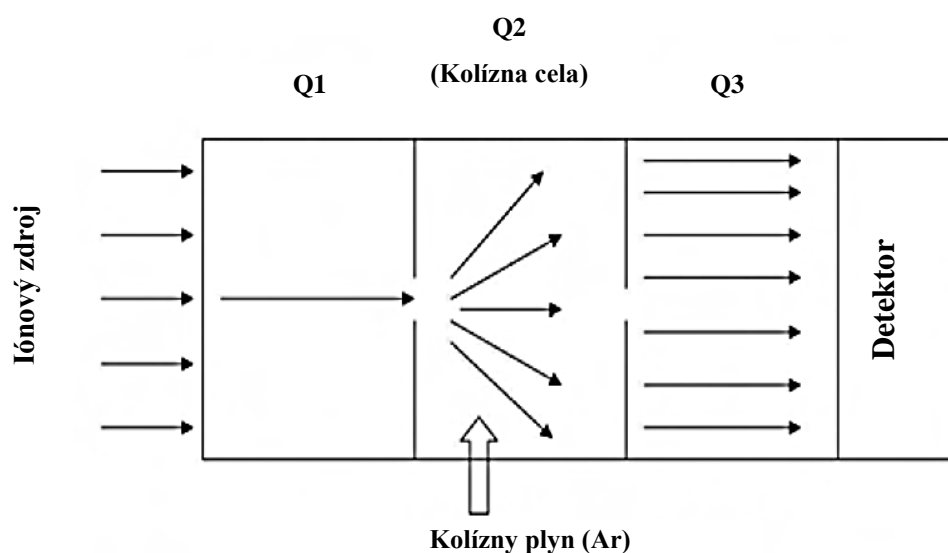
Hlavné uplatnenie tandemovej hmotnostnej spektrometrie spočíva v identifikácii látok v komplexných zmesiach, v objasnení fragmentačných procesov a v možnosti kvantifikácie látok v komplexných vzorkách [23, 25, 37].

3.3.8 Typy skenov MS, MS/MS

Typy skenov MS a MS/MS budú vysvetlené s využitím trojitého kvadrupólu (QqQ): QqQ sa skladá z troch kvadrupólov radených za sebou, pričom druhý z nich slúži ako kolízna cela, kde dochádza k fragmentácii iónov (Obr. 13) [20].

Existuje viacero možností zberu dát v hmotnostnej spektrometrii. Použitá metóda závisí od potreby operátora, ktorý mód zvolí pre danú vzorku. Všetky módy pracujú na inom princípe a podávajú rôzne informácie [20, 31]. Možnosti nastavenia módov trojitého kvadrupólu zhrňuje Tabuľka 2. [29, 38]:

Obr. 13: Trojitý kvadrupól: schéma [4]



Tabuľka 2: Nastavenie trojitého kvadrupólu

Skenovací mód	Q1	q2	Q3	Poznámka
Základný MS sken	skenuje	neaktívny	neaktívny	Q1 a Q3 zameniteľné
SIM	fixný m/z	neaktívny	neaktívny	možnosť viac iónov
Sken produktových iónov	fixný m/z	aktívny	skenuje	Q1 nízke rozlíšenie pre izotopy
Sken prekursorových iónov	skenuje	aktívny	fixný m/z	hľadanie homológov
Sken NL	skenuje	aktívny	skenuje	Q1 a Q3 synchronne
SRM	fixný m/z	aktívny	fixný m/z	možnosť viac premien

Typy skenov MS:

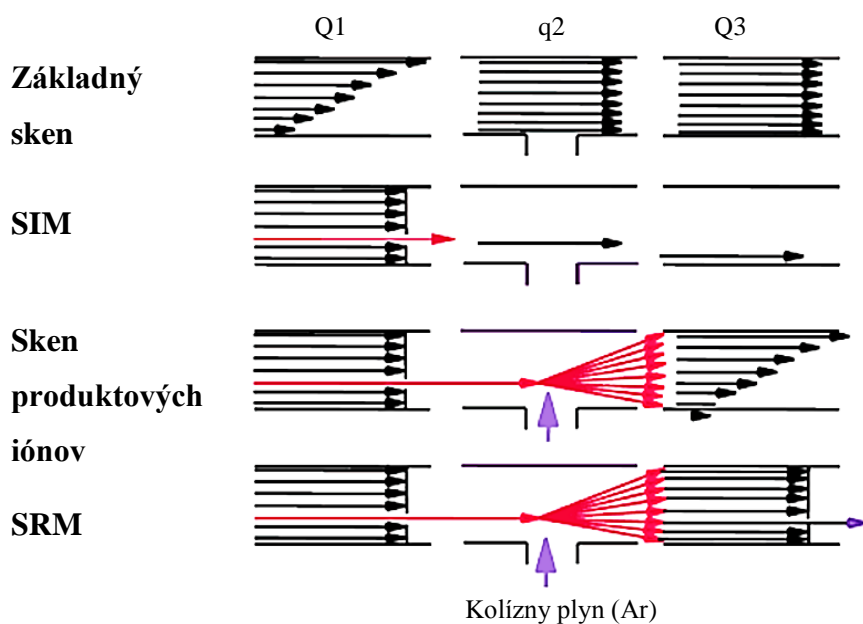
- základný sken (full scan): zmeranie hmotnostného spektra v celom rozsahu m/z
- selektívny záznam jedného alebo viacerých iónov (SIM): analyzuje sa len závislosť signálu vybraného iónu na čase
- rekonštruované iónové chromatogramy vybraných hmotností (RIC)

Typy skenov pre MS/MS:

- sken produktových iónov: zmerané MS/MS spektrum vybraného prekursoru
- sken iónov prekursoru: pre vybraný fragmentový ión určíme pôvodný ión prekursoru, z ktorého vznikol fragmentáciou
- sken neutrálnych strát (NL): stanovíme charakteristické dvojice iónov prekursorov a produktov, pri ktorých došlo k odštiepeniu vybranej hmotnostnej straty, napr. vody, alebo glukózy
- selektívny záznam jednej alebo viacerých iónových reakcií (SRM): prvým analyzátorom sa vyberie ión prekursoru, ktorý v kolíznej cele fragmentuje a sleduje sa len vybraný charakteristický fragmentačný ión [19, 29, 31].

Obr. 14. schematicky zobrazuje prechod iónov trojitým kvadrupólom pri nastavení určitých typoch módov [12].

Obr. 14: Skenovacie funkcie QqQ



3.3.9 Výhody MS

Široká popularita MS je výsledkom jej jedinečných schopností:

- Poskytuje významné molekulárne špecifiká, pre jej schopnosť merať presné molekulové hmotnosti a poskytovať informácie o štruktúre diagnostikovaných fragmentových iónov analytu.
- Umožňuje ultra-vysokú citlivosť detekcie. Teoreticky má MS schopnosť detegovať jedinú molekulu.
- Poskytuje všestrannosť pre určenie štruktúry väčšiny tried zlúčenín.
- Je použiteľná pre všetky typy vzoriek: prchavé a neprchavé, polárne alebo nepochopárne, tiež pre kvapalné aj plynne materiály.
- V kombinácii s vysokým rozlíšením separačného zariadenia poskytuje identifikáciu analyzovanej komplexnej vzorky [25].
- Zaisťuje rýchlosť a poskytuje rozmanitosť aplikácii [31].

3.4 Spojenie HPLC/MS

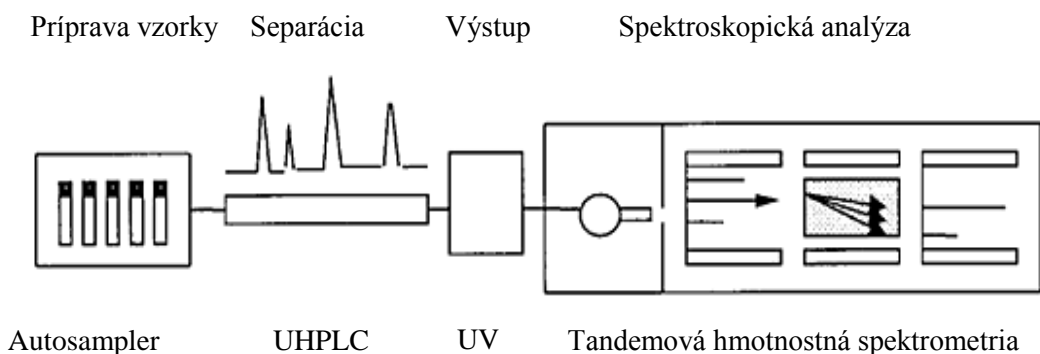
LC/MS a LC/MS/MS kombinujú všestrannosť HPLC s citlivosťou a selektivitou detekcie MS [27].

Spojenie HPLC/MS, ktorého schéma je uvedená na Obr. 15, umožňuje separáciu a identifikáciu zložitých komplexov v jednej analýze. Prináša kombináciu výhod obidvoch techník, ako je minimalizácia objemov vzoriek, výrazné skrátenie doby analýzy, vysoké rozlíšenie a citlivosť [20, 39].

Tomuto spojeniu predchádzala kombinácia plynovej chromatografie (GC) a MS. GC/MS je stále dôležité pre analýzu mnohých organických zlúčenín, ale táto technika je obmedzená na prchavé a tepelne stále zlúčeniny, ktoré tvoria len malý zlomok organických zlúčenín [3, 20].

HPLC/MS má výhodu vo využití pre analýzu polárnych, málo prchavých zlúčenín a látok tepelne nestálych. Vývoj spojenia komplikovali problémy pri ionizácii z kvapalnej fázy, nadbytok rozpúšťadla a prechod z atmosférického tlaku do oblasti vysokého vákua [3, 20].

Obr. 15: Bloková schéma LC-MS systému [40]:



V súčasnosti sú technické obmedzenia vyriešené a využitie oboch techník je bežnou praxou. Ako kompatibilná mobilná fáza pre HPLC/MS sú preferované prchavé rozpúšťadlá v čo najmenších koncentráciách (napr. kyselina mravčia) [20, 31].

Ionizačné techniky pre HPLC/MS pracujú za atmosférického tlaku a znamenali prielomové riešenie technológie rozhrania HPLC/MS [20]. Výhodou ESI a APCI je nezávislosť práce na vákuových pumpách, na odstránení rozpúšťadla a sú kompatibilné s väčšinou prietokov HPLC [41]. Dnes je HPLC/MS vďaka ESI či APCI rutinná a spoľahlivá analytická technika s obrovským potenciálom v analytickej chémii, biochémií, farmaceutickej a klinickej analýze, medicíne a ďalších odboroch, kde je potrebná kvalitatívna a kvantitatívna charakterizácia komplexných organických, bioorganických a organokovových zmesí [20, 36]. Z pohľadu aplikácie vo farmaceutickom priemysle ťažilo spojenie LC/MS z tradície používania HPLC a z rastúceho trendu získavania štruktúrnych a kvantitatívnych informácií, hlavná je tu však separačná schopnosť HPLC a identifikačná schopnosť MS [40].

Ideálnym analyzátorom pre LC je kvadrupól, pretože je schopný rýchlo skenovať a používa nízke napätie, čo ho robí tolerantným k vysokým prevádzkovým tlakom, ktoré sa vyskytujú pri spojení LC/MS [39].

Skupina rýchlych LC-MS techník zahŕňa rôzne prístupy so spoločným cieľom dosiahnuť najvyššiu priepustnosť vzorky a dobrú separačnú účinnosť. Najrozšírenejšia a dobre zavedená metóda je UHPLC, popísaná v kapitole 3.2, umožňuje rýchlu analýzu s úzkymi chromatografickými píkmi. Na druhej strane, vyžaduje vyššiu rýchlosť hmotnostného spektrometra na dosiahnutie dostatočného odberu vzoriek pre spoľahlivú integráciu pík. Typické šírky pík v bežných HPLC-MS sú 3 - 10 s, zatiaľ čo šírky pík v UHPLC-MS sú všeobecne v rozmedzí 1 - 3 s, ale môžu byť užšie ako 1 s za dobre optimalizovaných podmienok [36].

Takmer všetky LC-MS systémy sú vybavené ESI, niekedy sprevádzané APCI pre menej polárne zlúčeniny a normálne fázy LC. Hlavné oblasti použitia ESI sú v charakterizácii biomolekúl, iónových a veľmi labilných organických a organokovových zlúčenín [36]. Bolo preukázané, že kombinácia UHPLC/ESI/MS/MS je univerzálnym nástrojom pre rýchlu analýzu a citlivé detekcie bioaktívnych produktov v rastlinných extraktoch. Popularita a rozšírenie tejto techniky je spôsobené množstvom analytických informácií, ktoré môžeme získať [1, 20].

Súčasný LC-MS systémy generujú obrovské množstvo analytických údajov, ktoré je často nemožné interpretovať ručne, preto sa vývoj venuje aj rozvoju software, ktoré môžu pomôcť s automatizáciou spracovania dát a ich interpretáciu [36, 41].

LC/MS nástroje sú stále dostupnejšie a počet LC/MS aplikácií neustále rastie, najmä vďaka zníženiu nákladov týchto prístrojov a ich osvedčenej separačnej a identifikačnej účinnosti [42].

3.5 Analýza rastlinných extraktov

Spojenie chromatografických techník s rôznymi technikami hmotnostnej spektrometrie je najúčinnnejšou analytickou metódou na identifikáciu a štruktúrne štúdie prírodných látok v rastlinných výťažkoch. Priame prepojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS) je vhodné pre identifikáciu voľných fenolových aglykonov, ale nie je vhodné pre analýzu príslušných vysoko polárnych, tepelne labilných glykosidických konjugátov s vysokou molekulovou hmotnosťou. Kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou prekonáva tieto obmedzenia, a poskytuje cenný nástroj pre analýzu sekundárnych metabolitov rastlín v širokom rozsahu polarít [43].

V posledných 15-tich rokoch sa stala HPLC spojená s MS a NMR (nukleárna magnetická rezonancia) základným nástrojom v analýze prírodných produktov, kde je hlavným cieľom izolácia, identifikácia a často kvantitatívna analýza obsahových látok [10].

Kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou je účinný nástroj pre charakterizáciu chemických látok v rastlinných výťažkoch. Fragmentácia flavonoidov pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie bola intenzívne skúmaná, a tak umožňuje charakterizáciu neznámych látok, aj keď nie sú k dispozícii referenčné štandardy. Okrem toho vysoká citlivosť MS ako detektoru pre LC umožňuje

objavovanie nových minoritných zložiek, ktoré sa ťažko zisťujú konvenčnými fytochemickými metódami [44].

HPLC je jednou z najpopulárnejších metód pre analýzu liečivých rastlín. Všeobecne povedané, pretože nie je limitovaná prchavosťou ani stabilitou vzorky, môže byť HPLC použité k analýze takmer všetkých zlúčenín v rastlinách. Preto bola HPLC počas posledného desaťročia najčastejšie používanou metódou analýzy prírodného rastlinného materiálu. Kolóny s reverznou fázou sú pravdepodobne najpopulárnejšími kolónami používanými pri analytickej separácii rastlinných liečiv. Optimálne separačné podmienky pre HPLC zahŕňajú mnohé faktory, ako je rôzne zloženie mobilnej fázy, úprava pH a ďalšie. Preto je experimentálne nastavenie nevyhnutné pre optimálnu separáciu. Výhoda HPLC spočíva v jej univerzálnosti pre analýzu chemických zlúčenín v rastlinách. Avšak bežné detektory používané pri HPLC, najmä UV detektor s jedinou vlnovou dĺžkou nie sú schopné splniť túto podmienku, pretože mnoho chemických zlúčenín v rastlinách nemá chromofor. Kvalitatívna analýza, alebo odhad štruktúry chemických zlúčenín nie je možný s použitím samostatnej HPLC, ale vyžaduje použitie HPLC technik kombinovaných s MS či NMR [10]. Ani pomocou hmotnostnej spektrometrie nemôžu byť detegované všetky zlúčeniny z komplexnej zmesi bez predchádzajúcej chromatografickej separácie. Preto sa LC/MS stalo mocným nástrojom pre analýzu prírodných látok, syntetických organických zlúčenín, farmaceutických látok a ich metabolitov [41].

3.5.1 Fenolické látky

Fenolické látky predstavujú skupinu vysoko komplexných prirodzene sa vyskytujúcich molekúl v rastlinách, ktoré majú celý rad biologických a fyziologických funkcií a slúžia ako chemotaxonomické markerové zlúčeniny [45]. Rastlinné fenolické látky (označované tiež ako polyfenoly) sa skladajú zo širokého spektra sekundárnych metabolitov, majúcich charakteristické štruktúrne prvky: najmenej jeden aromatický kruh substituovaný aspoň jednou hydroxylovou skupinou, voľnou alebo vo forme éteru, esteru či glykosidu [10, 46]. Tieto zlúčeniny sú identifikované vo významnom množstve v plodoch a ovocných šťavách, udávajú ich fyziologické a organoleptické vlastnosti (chuť, vôňa, farba) [10].

Zvýšenie fenolického metabolizmu rastlín je často spojované so zvýšenou rezistenciou rastlín proti rôznym patogénom. Využitie zvýšenej rezistencie v ochrane rastlín sa stalo sľubným prístupom proti niekoľkým bakteriálnym, fungálnym a vírusovým rastlinným ochoreniam počas poslednej dekády, pretože aplikácia určitých netoxických chemikálií môže aktivovať endogénny obranné mechanizmy rastlín, poskytujúc dlhotrvajúcu širokospektrálnu rezistenciu [47].

Pri polyfenolických látkach, obzvlášť katechínov, boli zistené prospešné ochranné účinky proti ľudským degeneratívnym chorobám, ateroskleróze, chronickému pečňovému zlyhávaniu, alebo niektorým druhom rakoviny [48]. Antioxidačná aktivita fenolických látok, ktorá je pripisovaná hydroxylovej skupine na aromatickom jadre, je dôležitá pre tieto účinky. V porovnaní polyfenolov a fenolických kyselín sú kyseliny rozpustnejšie vo vode a preto ľahšie biologicky dostupné [49].

Plody čeľade Rosaceae sú známym a bohatým zdrojom fenolických zlúčenín. Ale málo je známe o fenolických látkach v listoch [47]. Množstvo a typ fenolických látok sa líši v rôznych vývojových štádiách rastliny. Rastliny toho istého druhu môžu mať rôzny obsah a zastúpenie fenolických látok, čo výrazne sťažuje ich standardizáciu [49].

Fenolické látky sa skladajú hlavne z fenolických kyselín (deriváty škoricovej a benzoovej kyseliny), flavonoidov, a anthokyanov (a štruktúrne podobných zlúčenín), a tiež tanínov a stilbenov [10].

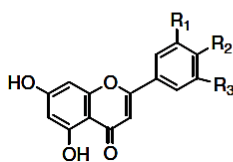
Voľne klasifikované sa delia na flavonoidy a neflavonoidné zlúčeniny [46]. Flavonoidy sú najväčšou skupinou fenolických látok a sú najpočetnejšou a najrozšírenejšou skupinou sekundárnych metabolitov rastlín. Spoločnú majú $C_6-C_3-C_6$ flavonovú kostru [43]. Rozdelené sú do tried podľa odlišného oxidačného stavu centrálného heterocyklického kruhu (Obr. 16). Zahrňajú flavonoly, flavóny, izoflavóny, flavanony, anthokyaniny a flavanoly (katechíny a triesloviny). Neflavonoidné zlúčeniny tvoria jednoduché fenoly, fenolové kyseliny (deriváty kyseliny benzoovej a škoricovej), kumaríny, xanthony, chalkóny, stilbeny a lignany [46].

Biosyntéza flavonoidov je predvedená na príklade naringenínu (Obr. 17). Flavonoidy sú tvorené sériou kondenzačných reakcií medzi kyselinou hydroxyškoricovou (B-kruh a uhľíky 2, 3 a 4 z C-kruhu) a malonylovým zbytkom (kruh-A), čím vznikne základná $C_6-C_3-C_6$ štruktúra. Trojuhlíkatý reťazec medzi fenylovými kruhmi je zvyčajne zacyklený do tretieho kruhu [45]. Táto základná štruktúra 2-fenylchromanu je znázornená na Obr. 18 [50].

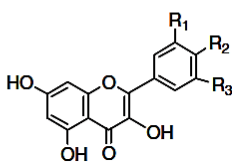
Obr. 16: Rozdelenie fenolických látok [46]

FLAVONOIDY

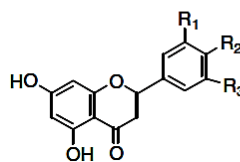
Flavony



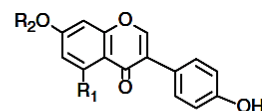
Flavonoly



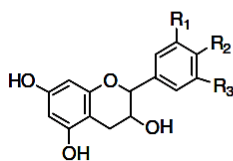
Flavonony



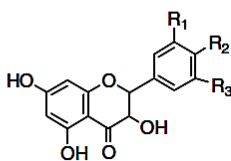
Izoflavony



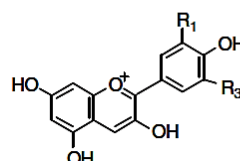
Flavanoly



Flavanonoly

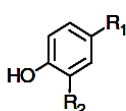


Anthokyanidíny

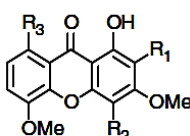


NEFLAVONOIDNÉ ZLÚČENINY

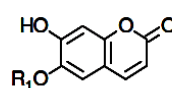
Jednoduché fenoly



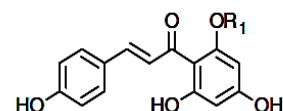
Xanthy



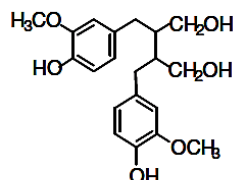
Kumaríny



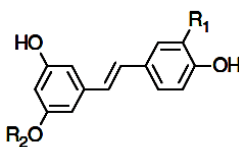
Chalkony



Lignany



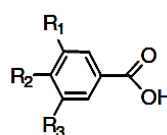
Stilbeny



Fenolové kyseliny

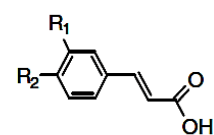
Deriváty kyseliny

benzoovej

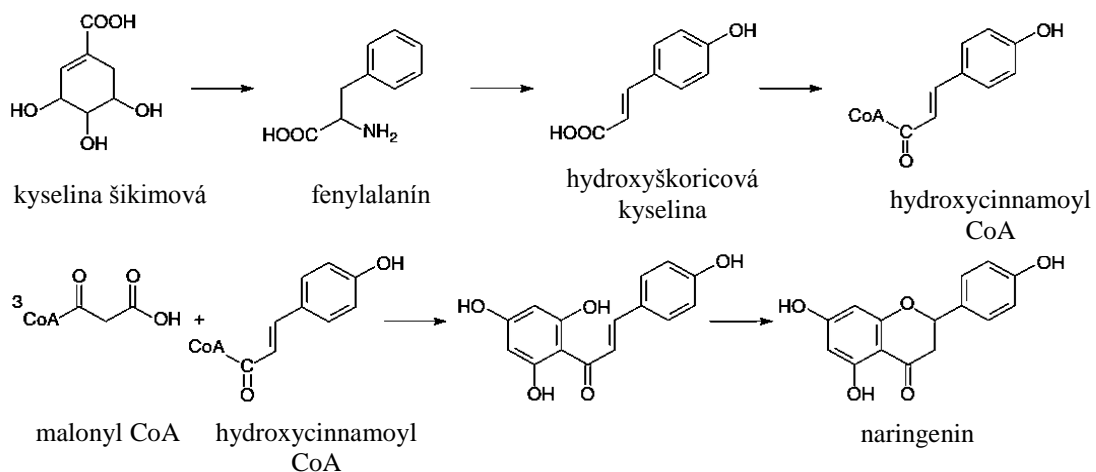


Deriváty kyseliny

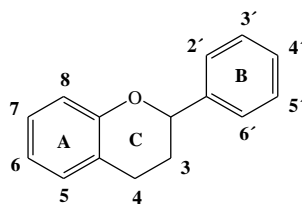
škoricovej



Obr. 17: Ukážka biosyntézy flavonoidov

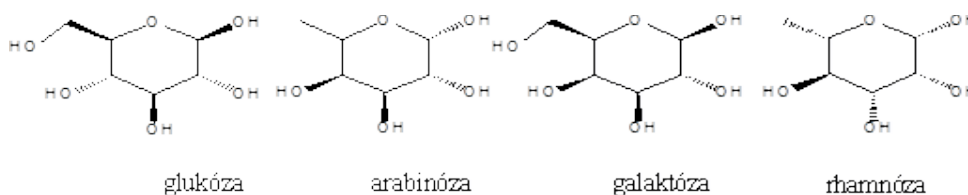


Obr. 18: Číslovanie základného skeletu flavonoidov



V rastlinách sa flavonoidy objavujú ako voľné aglykony alebo v rôznych modifikovaných formách v závislosti na hydroxylácii, metylácii a hlavne glykosilácii. Občas sú na flavonoidné jadro pripojené aromatické alebo alifatické kyseliny, sulfát, prenyl, isoprenyl a ich glukosidy. Flavonoidy sa bežne nachádzajú ako O-glykosidy, kedy na jednu alebo viacero hydroxylových skupín sú naviazané cukrové jednotky pomocou glykosidickej O-C väzby [45]. Efekt glykosilácie je zníženie reaktivity flavonoidov a zvýšenie rozpustnosti vo vode [43]. V princípe môže byť každá hydroxylová skupina glykosilovaná, ale niektoré pozície sú preferované, napr.: 7-hydroxyskupina flavanov, flavonov a isoflavonov, 3- a 7-hydroxyskupina flavonolov a flavanolov, 3- a 5-hydroxyly anthokyanov. Flavonoidné C-glykosidy boli popísané len na C-6 a C-8 pozíciách flavonoidného jadra. Najčastejšie sa objavuje glukóza, menej galaktóza, rhamnóza, xylóza či arabinóza (Obr. 19). Neobvyklé nie sú ani fruktóza a manóza [45]. Zriedkavé sú glukurónové a galakturónové kyseliny [43]. Taktiež často sú nachádzané disacharidy ako rutinóza alebo neohesperidóza, menej sú to tri- a tetrasacharidy [45].

Obr. 19: Najčastejšie sacharidové jednotky flavonoidov [51]



3.5.2 Metódy stanovenia fenolických látok

S ohľadom na polárny charakter fenolických látok sú považované za vhodné extrakčné rozpúšťadlá alkoholy (methanol, ethanol, propanol) a acetón, prípadne ich zmes s vodou. Trochu iné izolačné procedúry sú používané pre anthokyaníny, kde sú doporučované okyslené organické rozpúšťadlá (najčastejšie methanol). Pred kvantifikáciou fenolických látok pomocou HPLC musia byť prevedené rôzne

separačné a frakcionačné procedúry, aby sa oddelili hydrofóbne balastné látky, ako chlorofyl, vosky, mastné kyseliny alebo terpény [10]. Vďaka vysokej selektivitě MS, zvlášť v kombinácii s LC, nie je potrebná žiadna náročná príprava vzorky [45].

HPLC je dnes najčastejšie používanou technikou pre separáciu, kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu polyfenolov [10, 46]. LC/MS predstavuje veľmi účinný nástroj pre analýzu prírodných produktov. MS je univerzálny detektor, schopný dosiahnuť vysokej citlivosti a poskytuje informácie o molekulovej hmotnosti a štruktúrnych znakoch. Detailnejšie štruktúrne informácie môžu byť získané pomocou tandemovej hmotnostnej spektrometrie v kombinácii s kolíziou vyvolanou disociáciou. S ohľadom na štruktúrnú charakterizáciu flavonoidov môžeme získať informácie o flavonoidnom aglykone, typoch sacharidov alebo iných prítomných substituentov, stereochemii terminálneho monosacharidu, sekvencii cukrovej časti, medziglykozidických väzbách a o pozíciách pripojenia substituentov na aglykón [45].

Flavonoidy a príbuzné zlúčeniny

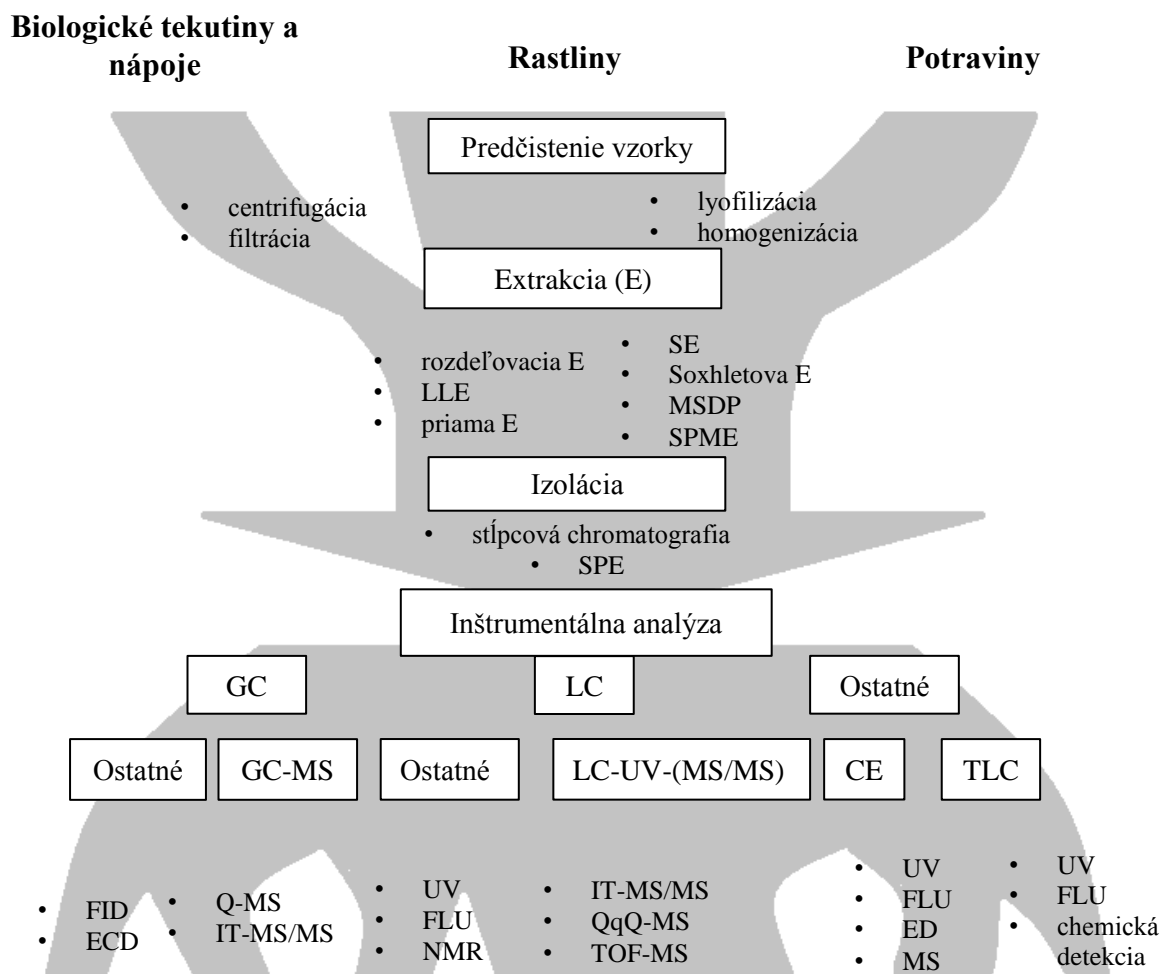
Flavonoidy boli detegované takmer vo všetkých druhoch vyšších rastlín. To, spolu s faktom, že sú jednoducho detekovateľné aj s použitím jednoduchých techník ako je PC (papierová chromatografia) a TLC (tenkovrstvá chromatografia), urobilo z flavonoidov najlepšie preskúmanú skupinu sekundárnych metabolitov rastlín v začiatkoch chemosystematického výskumu. Analýza flavonoidov je zvlášť vhodná pre demonštráciu technologického pokroku v chemosystematickom výskume od roku 1940 do dnes. Bate-Smith publikovali prelomovú správu o použití dvojdimenzionálnej PC pre detekciu anthokyanínov a príbuzných zlúčenín v roku 1948. PC bola čoskoro prekonaná a nahradená TLC vo väčšine aplikácií [10].

HPLC prvý raz použili v analýze flavonoidov na začiatku sedemdesiatych rokov. Ďalším krokom bol vývoj on-line prepojenia HPLC s MS. V tom čase boli tiež vykonané prvé kroky k on-line spojeniu HPLC-NMR (nukleárna magnetická rezonancia). NMR sa často využíva k MS ako doplnkové určenie štruktúry [52]. Nasledovalo použitie týchto metód vo výskume flavonoidov [10].

Väčšina publikovaných prác o MS štúdiách rastlinných flavonoidov sa zameriava na flavonoidné aglykony alebo O-glykosidy, ktoré sú dominantnými konjugátmi [43]. Kolízna indukovaná disociácia (CID) v tandemovej hmotnostnej spektrometrii sa ukázala byť najdôležitejším nástrojom objasnenia nie len základnej flavonoidnej štruktúry [52].

Obr. 20 prehľadne znázorňuje dostupné stratégie, ktoré boli použité k stanoveniu flavonoidov v potravinách, rastlinných vzorkách, biologických tekutinách a nápojoch v posledných rokoch. Zhrňuje možnosti prípravy vzorky: predčistenie vzorky, extrakciu a izoláciu, a ďalej možnosti samotnej inštrumentálnej analýzy flavonoidov [51].

Obr. 20: Stratégia pre stanovenie flavonoidov v biologických tekutinách, nápojoch, rastlinných vzorkách a potravinách.



Skratky: LLE - extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, SE - extrakcia rozpúšťadlom, MSPD - maticová extrakcia na pevnej fáze, SPME - mikroextrakcia na pevnej fáze, SPE - extrakcia na pevnej fáze, GC - plynová chromatografia, LC - kvapalinová chromatografia, MS - hmotnostná spektrometria, MS/MS - tandemová hmotnostná spektrometria, CE - kapilárna elektroforéza, TLC - tenkovrstvá chromatografia, FID – plameňová detekci, ECD - detektor elektrónového záchytu, Q - kvadrupól, QqQ - trojitý kvadrupól, IT - iónová pasca, FLU - fluorescencia, NMR - nukleárna magnetická rezonancia, TOF - analyzátor doby letu, ED - elektrochemická detekcia [51].

3.6 Jahoda obyčajná

FRAGARIA VESCA L.

jahoda obyčajná / jahodník obecný

Čeľad': Rosaceae

Obr. 21 a Obr. 22 [53, 54].

Jahoda (*Fragaria spp.*) patrí na svete medzi rozšírené poľnohospodárske plodiny a liečivé rastliny. Ako mnoho ďalších druhov ovocia patrí do podčeľade Rosoideae a čeľade Rosaceae. Je známa širokou škálou sekundárnych metabolitov. Zloženie fenolických zlúčenín je obzvlášť dobre preštudované v niekoľkých druhov plodoch čeľade Rosaceae, vrátane jahody [55].

Okrem flavonoidov, anthokyanínov a ďalších rozšírených fenolických látok je v čeľadi Rosaceae prítomné významné množstvo ellagovej kyseliny a ellagitannínov [55]. Jahoda obsahuje širokú škálu fenolických zlúčenín ako fenolické kyseliny, flavonoly (deriváty kaempferolu a quercetínu), anthokyaníny (deriváty cyanidínu a pelargonidínu), proanthokyanidíny, galloylglukosy a ellagitaníny. Zloženie metabolitov sa mení počas dozrievania plodu [55].

Zdokumentované boli rôzne prospešné biologické účinky jahodových plodov ako je protirakovinová aktivita, antioxidačný účinok, antitrombotický účinok a iné [56].

Obr. 21.: *Fragaria vesca* L.



Plody jahody obvyčajnej obsahujú veľké množstvo fenolických látok, vďaka čomu vykazujú niekoľkonásobne vyššiu antioxidačnú aktivitu ako iné bežne pestované odrody jahody. Na rozdiel od jahodových plodov boli jahodové listy ako zdroj bioaktívnych látok s potencionálne prospešnými biologickými účinkami z veľkej časti prehliadané. Preukázaný bol vazodilatačný účinok extraktu listov z *Fragaria vesca* L. [56].

Jahoda obvyčajná sa často využíva v tradičnej medicíne na podporu metabolizmu, ako adstringens a diuretikum. Listy sú používané v bežnej populácii na prípravu čaju [56].

Obr. 22: *Fragaria vesca* L. - fotografia



3.7 Prehľad metód hodnotiacich obsahové látky *Fragaria* sp.

Niekoľko štúdií profilujúcich metabolity a štúdií zameraných na identifikáciu jedného alebo viacerých metabolitov bolo publikované pre plod i list jahody. Metabolity jahody boli identifikované pomocou rôznych techník, okrem LC-MS boli tiež podrobené novým technikám profilujúce metabolity ako je iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou a koloidne grafitom asistovaná laserovo desorpčná ionizačná MS [55].

Tabuľka 3: Obsahové látky *Fragaria sp.*

Zlúčeniny	MW	Orgán
Deriváty škoricovej kyseliny		
Glukosid p-kumarovej kyseliny	326	Fr, F, L
Chlorogenová kyselina	354	F, L
Fenylpropanoidné glukosidy		
eutigosid A		
2-(4-hydroxyfenyl)etyl-(6-O-(E)-kumaroyl)- β -Dglukopyranosid	446	L
2-(4-hydroxyfenyl)etyl-(6-O-(Z)-kumaroyl)- β -Dglukopyranosid	446	L
4-(2-hydroxyfenyl)etyl-(6-O-(E)-kumaroyl)- β -Dglukopyranosid	446	L
grayanosid A;		
2-(4-hydroxyfenyl)etyl-(6-O-(E)-feruloyl)- β -Dglukopyranosid	476	L
2-(4-hydroxyfenyl)etyl-(6-O-(E)-kafeoyl)- β -Dglukopyranosid	476	L
Kyselina gallová a ellagová		
pentosid ellagovej kyseliny	434	Fr, L , F
ellagová kyselina	302	Fr, L , F
acetylpentosid ellagovej kyseliny	476	Fr, L
deoxyhexosid ellagovej kyseliny	448	Fr, L , F
hexosid ellagovej kyseliny	464	L , F
glukogallin, galloylglukosa	332	Fr, F, L
galloylchinová kyselina	344	F, L
tri-galloylglukosa	636	F, L
penta-galloylglukosa	940	F, L
Ellagitaniny		
bis-HHDP-glukosa	784	Fr, F, L
galloyl-HHDP-glukosa	634	Fr, F, L
galloyl-bis-HHDP-glukosa	936	Fr, L
sanguiin H10	1568	L
tri-galloyl-HHDP glukosa	938	F, L
di(HHDP-galloylglukoso)-pentosa	1416	L
kasuariktin	936	L , F
trigalloyl-triHHDP-diglukosa	1718	L
potentillin	936	L , F
agrimoniin	1870	L , F

Flavan-3-oly, proanthokyanidin

(+)-katechin	290	Fr, F, L , R
dimer B2	578	Fr, F, L
proanthokyanidinový trimer (EC-4,8-EC-4,8-C)	866	Fr, F, L

Flavonoly

quercetin pentoso-glukuronid	610	F, L
quercetin 3-glukuronid	478	Fr, L , F
quercetin-deoxyhexoso-hexosid (nie rutín)	610	L
quempferol 3-glukuronid	462	Fr, F, L
kaempferol 3-kumaroyleglukosid (tilirosid)	594	Fr, F, L
kaempferol hexosid glukuronid	624	F, L
kaempferol pentosid glukuronid	594	F, L

Skratky: F - flos (kvet), Fr - fructus (plod), L - folium (list), R - radix (koreň)

V jahode boli identifikované špecifické triedy zlúčenín ako fenolické kyseliny, ellagitanníny, anthokyaníny, proanthokyanidíny a flavonoly. Súhrnný výpis jahodových metabolitov so zameraním na obsahové látky v listoch so 16 rôznych prác je uvedený v Tabuľka 3. [55].

Fenolické látky, ktoré identifikoval I. Mudnic et al. vo vodnom extrakte z listov jahody obyčajnej (*Fragaria vesca L.*) sú zhrnuté v Tabuľka 4. [56].

Tabuľka 4: Obsahové látky *Fragaria vesca L.*

Obsahové látky <i>Fragaria vesca L.</i>	Koncentrácia (mg/ml)	MW
(+)-Katechin	245,72	290
(-)-Epikatechin	259,36	290
Epigallokatechin	325,98	306
Procyanidin B1	175,06	578
Procyanidin B2	14,80	578
Epikatechin-3-galát	120,50	458
Quercetin-4-glukosid	39,93	464
Piceid (Polydatin)	6,64	390
Astringin	165,04	406
Trans-Resveratrol	1,95	228

4. Experimentálna časť

4.1 Použité chemikálie

Pre prípravu mobilnej fázy boli použité rozpúšťadlá:

kyselina mravčia - formic acid LC-MS, $\geq 98\%$, Sigma Aldrich, ČR

methanol LC-MS, $\geq 99,9\%$, Sigma Aldrich, ČR

ultračistá voda, Millipore, Milli-Q®, Nemecko

Ako štandardy boli použité:

Diosmin, $\geq 95\%$ HPLC, MW = 608,54, Sigma Aldrich, ČR

Epigallokatechin, $\geq 95\%$ HPLC, MW = 306,27, Sigma Aldrich, ČR

Epigallokatechin galát, $\geq 97\%$ HPLC, MW = 458,37, Sigma Aldrich, ČR

Epikatechin, $\geq 90\%$ HPLC, MW = 290,27, Sigma Aldrich, ČR

Hesperetin, $\geq 95\%$, MW = 302,28, Sigma Aldrich, ČR

Hesperidin, $\geq 90\%$ HPLC, MW = 610,56, Sigma Aldrich, ČR

Hyperosid, $\geq 97\%$ HPLC, MW = 464,38, Sigma Aldrich, ČR

Isoquercitrin, $\geq 97\%$ HPLC, MW = 464,38, Extrasynthése, Francúzsko

Kaempferol, $\geq 97\%$ HPLC, MW = 286,24, Sigma Aldrich, ČR

Kaempferol-3-O-glucosid, $\geq 99\%$ HPLC, MW = 448,38, Extrasynth., Fr.

Kaempferol-neohesperosid, $\geq 95\%$, MW = 594,52, Sigma Aldrich, ČR

Kaempferol-rutinosid, $\geq 98\%$, MW = 594,52, Sigma Aldrich, ČR

Katechin hydrát, $\geq 98\%$, HPLC, MW = 290,27, Sigma Aldrich, ČR

Luteolin, $\geq 97\%$ HPLC, MW = 286,24, Sigma Aldrich, ČR

Peltatosid, $\geq 99\%$ HPLC, MW = 596,50, Extrasynthése, Francúzsko

Quercetin, $\geq 95\%$ HPLC, MW = 302,24, Sigma Aldrich, ČR

Resveratrol, $\geq 99\%$ GC, MW = 228,24, Sigma Aldrich, ČR

Rhamnetin, $\geq 99\%$ HPLC, MW = 316,26, Sigma Aldrich, ČR

Rutin, $\geq 95\%$ HPLC, MW = 610,52, Sigma Aldrich, ČR

Tilirosid, $\geq 99\%$ HPLC, MW = 594,53, Extrasynthése, Francúzsko

Vzorka je suchý lyofilizovaný extrakt z listov *Fragaria vesca* L., pripravený na Farmaceutickej fakulte, Katedre farmakognózie pani docentkou RNDr. Jiřinou Spilkovou, CSc.

4.2 Prístroje a vybavenie

Acquity UPLC systém, Waters, ČR

kolóna Acquity UPLC BEH SHIELD RP18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m), Waters, ČR
hmotnostný analyzátor typ trojitého kvadrupólu Quattro Micro API, Waters, ČR
vákuová pumpa, Medist, SR

automatické pipety so špičkami, BIOHIT, ČR

membránové filtre 0,22 μ m, Chromservis, ČR

analytické váhy: Sartorius 2004, Sartorius, ČR

ultrazvukový kúpeľ: Sonorex digitec, Bandelin, Nemecko

laboratórna minitrepačka: Ika Works, Wortex, USA

4.3 Príprava mobilnej fázy, vzoriek a štandardov

Ako mobilná fáza boli použité 0,1 % roztok kyseliny mravčej a methanol LC/MS grade. Roztok kyseliny mravčej bol pripravený v digestore pred každým meraním z koncentrovanej kyseliny mravčej a ultračistej vody, vyrobenej na Farmaceutickej fakulte, prefiltrovanej pomocou vákuovej pumpy cez filtre s porositou 0,20 μ m. Na prípravu 250 ml bolo odmeraných 250 μ l kyseliny mravčej. Ako slabá oplachová kvapalina bol používaný 20 % vodný roztok methanolu a ako silná methanol. Všetky použité roztoky boli v čistote LC-MS.

Zásobné roztoky štandardov boli pripravené v koncentrácii 1mg/ml v methanole, okrem diosmínu, ktorý v ňom nie je rozpustný. Diosmín bol rozpustený v ultračistej vode. Zásobný roztok vzorky bol pripravený ako 0,2 % roztok. K urýchleniu rozpúšťania štandardov a vzorky boli použité ultrazvuk a minitrepačka. Ako vzorka bol použitý suchý extrakt z listov *Fragaria vesca* L. Po dôkladnom rozpustení bol roztok vzorky prefiltrovaný cez membránový filter s porositou 0,22 μ m. Zásobné roztoky boli skladované v chladničke.

K meraniu a analýze boli použité tieto zásobné roztoky, ktoré boli nariadené methanolom na konečnú koncentráciu 10^{-5} g/ml. Pripravené boli priamo do vialiek odpipetovaním 10 μ l zásobného roztoku na 1 mililiter. Zásobného roztoku diosmínu bolo odpipetovaného 50 μ l na mililiter a jeho konečná koncentrácia bola 5×10^{-5} g/ml.

4.4 Analytické podmienky

Parametre chromatografickej separácie

- kolóna: Acquity UPLC BEH SHIELD RP18 (100 x 2,1 mm; 1,7µm)
- mobilná fáza: 0,1% kyselina mravčia a methanol
- prietok: 0,450 ml/min
- nástriek: 3 µl
- gradient: nastavenie gradientovej elúcie zobrazuje Tabuľka 5.

Tabuľka 5: Nastavenie podmienok gradientovej elúcie UHPLC

t _R [min]	Prietoková rýchlosť [ml/min]	% A (kyselina mravčia)	% B (methanol)	Krivka
0,00	0,450	85	15	-
10,0	0,450	25	75	6
10,1	0,450	85	15	6
12,0	0,450	85	15	6

Nasledujú parametre iónového zdroja MS nastavené pre pozitívny a negatívny režim ESI ionizácie. Tabuľka 6 zhrňuje parametre MS analýzy.

Tabuľka 6: Parametre MS analýzy

Typ ionizácie	ESI ⁺ , ESI ⁻
m/z rozsah	120 - 800
Napätie na kapiláre	2,5 V
Napätie na vstupnom kuželi	30 V
Extraktorové napätie	3 V
Napätie na hexapóle	0,5 V
Teplota v zdroji	130 °C
Desolvatačná teplota	450 °C
Prietok desolvatačného N ₂	550 l/h
Prietok N ₂ na vstupnom kuželi	50 l/h

Nasledujú parametre Iónového zdroja a MS analyzátoru pre jednotlivé typy skenov (Tabuľka 7).

Tabuľka 7: Nastavenie parametrov iónového zdroja a MS analyzátoru pre jednotlivé typy analýzy

	MS sken	Skeny produktových iónov	NL
Rozmedzie m/z	128 – 800	vybrané m/z	podľa m/z
Doba analýzy (min)	0 – 12	0 – 12	0 - 12
CV (eV)	30 alebo 50	15 - 50	50
Mód ionizácie	ESI/ESI ⁺	ESI/ESI ⁺	ESI/ESI ⁺
Scan Time (s)	0,8	0,8	0,8

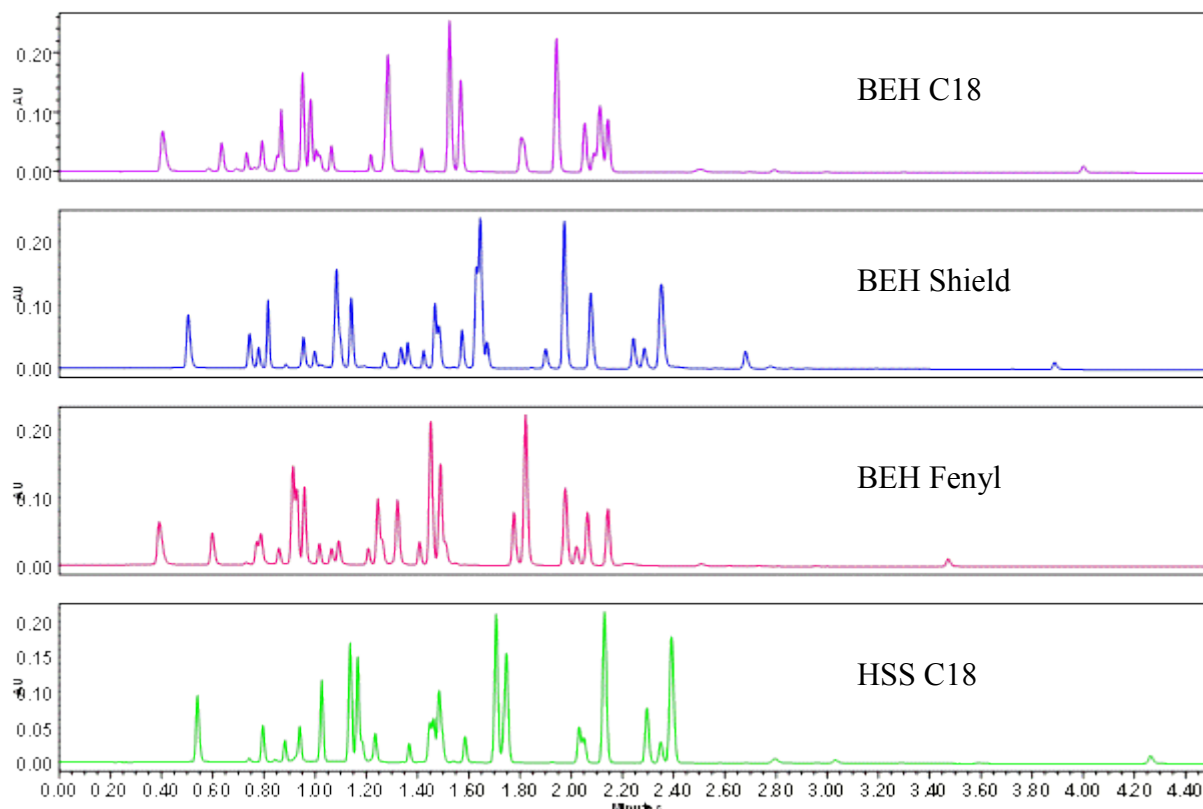
Identifikácia fenolických látok zo suchého extraktu *Fragaria vesca* L. prebiehala na prístroji. Pre identifikáciu zlúčenín boli vyhodnotené výsledky jednotlivých kvalitatívnych analýz. Údaje boli získané a spracované pomocou MassLynx verzii softvéru 4.1.

5. Výsledky a diskusia

5.1 Optimalizácia podmienok pre UHPLC systém

Boli upravené podmienky metódy publikovanej L. Novákovou et al. 2010 [57], doteraz používanej na katedre pri identifikácii flavonoidov. Skrátil sa čas analýzy z 28 na 12 minút pri zachovanej separačnej schopnosti. Obr. 23 Zobrazuje výber chromatografických analytických kolón. Po porovnaní chromatogramov bola vybraná kolóna typu BEH Shield RP18 namiesto pôvodnej BEH C18.

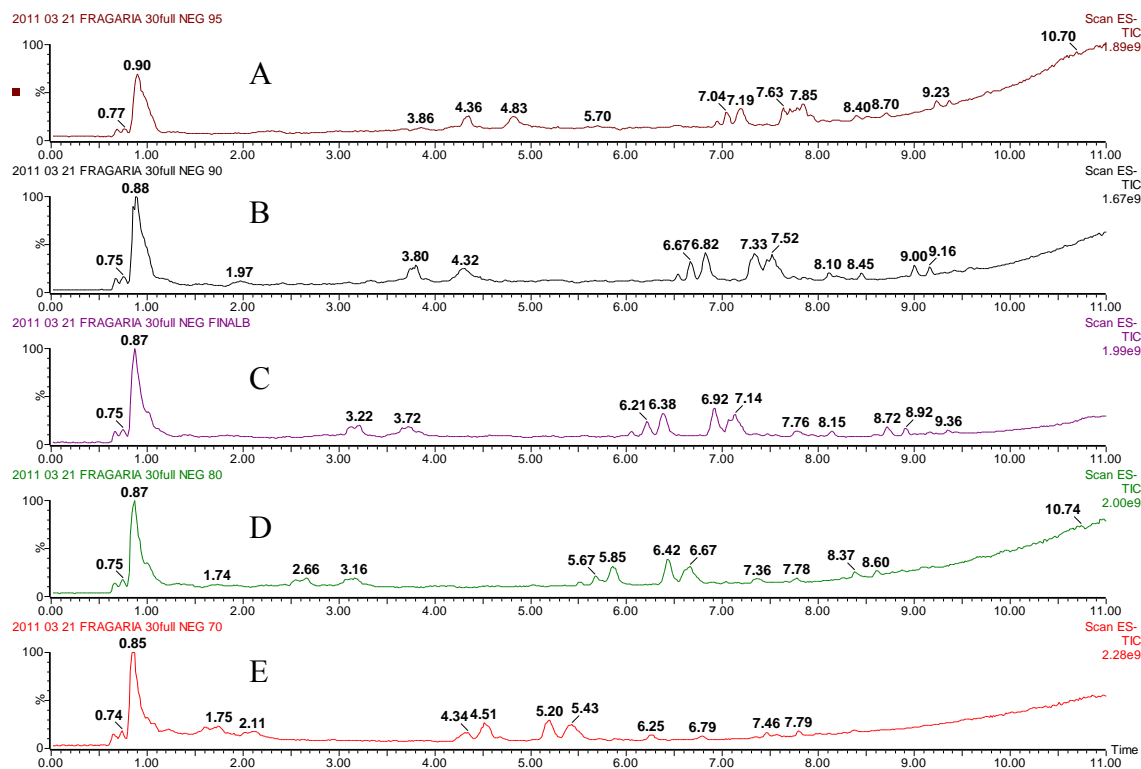
Obr. 23: Výber analytickej kolóny



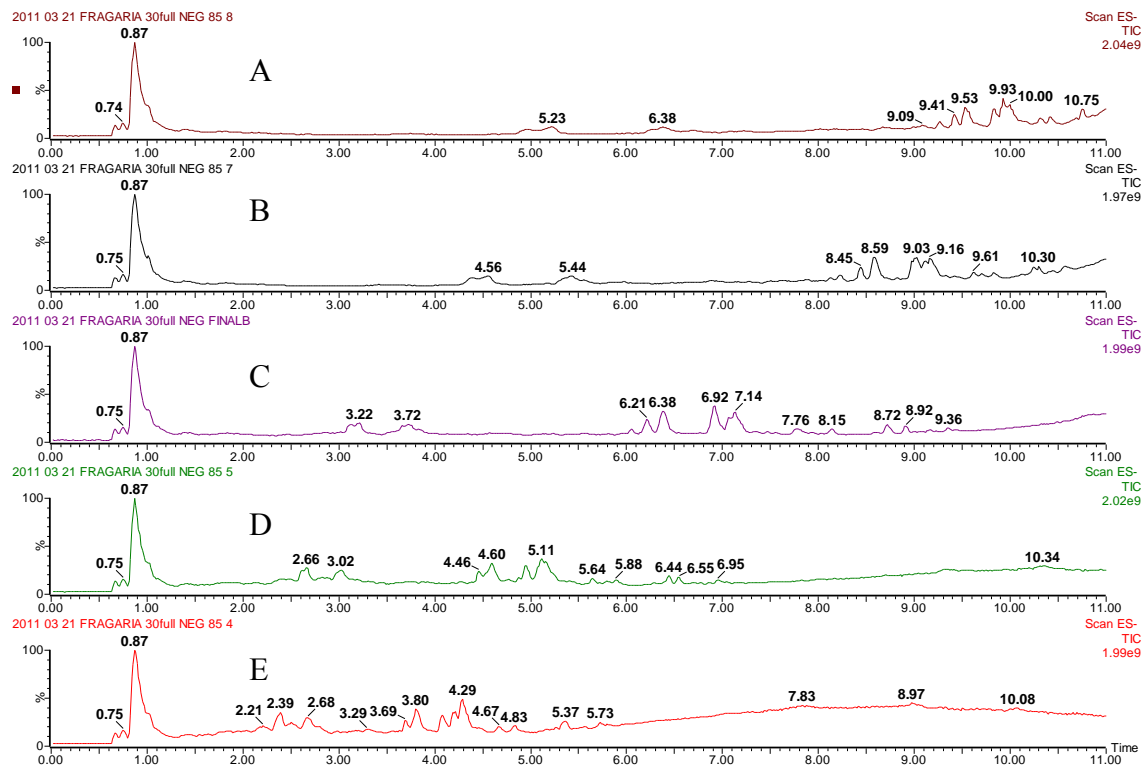
Ako stacionárna fáza bola teda použitá chromatografická kolóna Acquity UPLC BEH SHIELD RP18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m). Ako eluent bol použitý methanol a kyselina mravčia 0,1%. Potrebné bolo definovať zloženie mobilnej fázy na začiatku gradientovej elúcie (Obr. 24) a typ gradientovej krivky (Obr. 25). Prehľadná tabuľka bola uvedená v kapitole 4.4 (Tabuľka 5).

Pre overenie opakovateľnosti merania bolo meranie vykonané dvakrát a výsledné spektrá porovnané so slepou vzorkou, aby boli vylúčené interferujúce látky, prípadne látky pochádzajúce z metódy.

Obr. 24: Optimalizácia pomeru zložiek mobilnej fázy na začiatku gradientovej elúcie (methanol:kyselina mravčia 0,1 %; A- 95:5, B- 90:10, C- 85:15, D- 80:20, E- 70:30)



Obr. 25: Voľba gradientovej krivky pri pomere zložiek mobilnej fázy 85:15 na začiatku gradientovej elúcie (A- krivka 8, B- krivka 7, C- krivka 6, D- krivka 5, E- krivka 4)

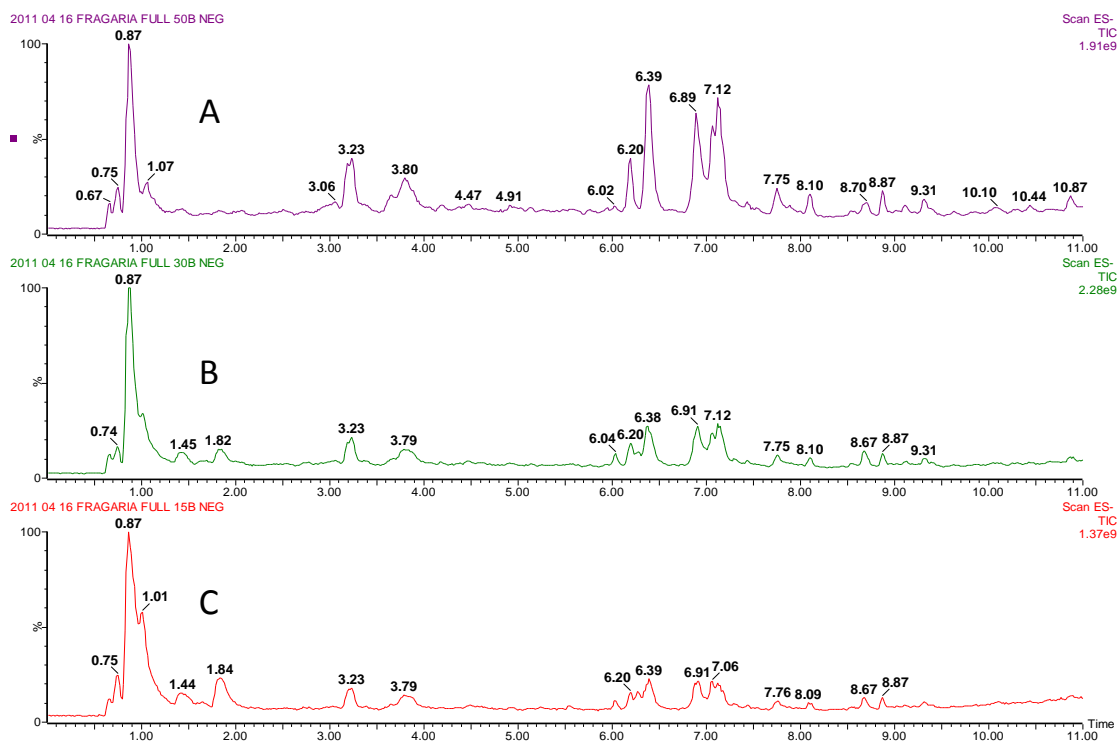


5.2 Optimalizácia podmienok pre základný MS sken

Zistené parametre z UHPLC boli aplikované na LC/MS. Ako typ ionizácie v MS detektore bola zvolená ionizácia elektrosprejom (ESI) v pozitívnom (ESI^+) a negatívnom móde (ESI $^-$), pretože látky dobre ionizujú.

Ako prvé bolo optimalizované napätie vkladané na vstupný kužel (cone voltage - CV) pre meranie základných spektier. Skúšané boli hodnoty 15, 30 a 50 V v ESI^+ aj ESI $^-$. Obr. 26 znázorňuje ukážku optimalizovaného CV v ESI $^-$. Najvhodnejšie výsledky v pozitívnom aj negatívnom režime boli dosiahnuté pri napätí 30 V, ktoré bolo zachované po celú dobu merania v MS.

Obr. 26: Porovnanie napätia na vstupnom kuželi pri A- 50, B- 30 a C- 15 V v ESI $^-$

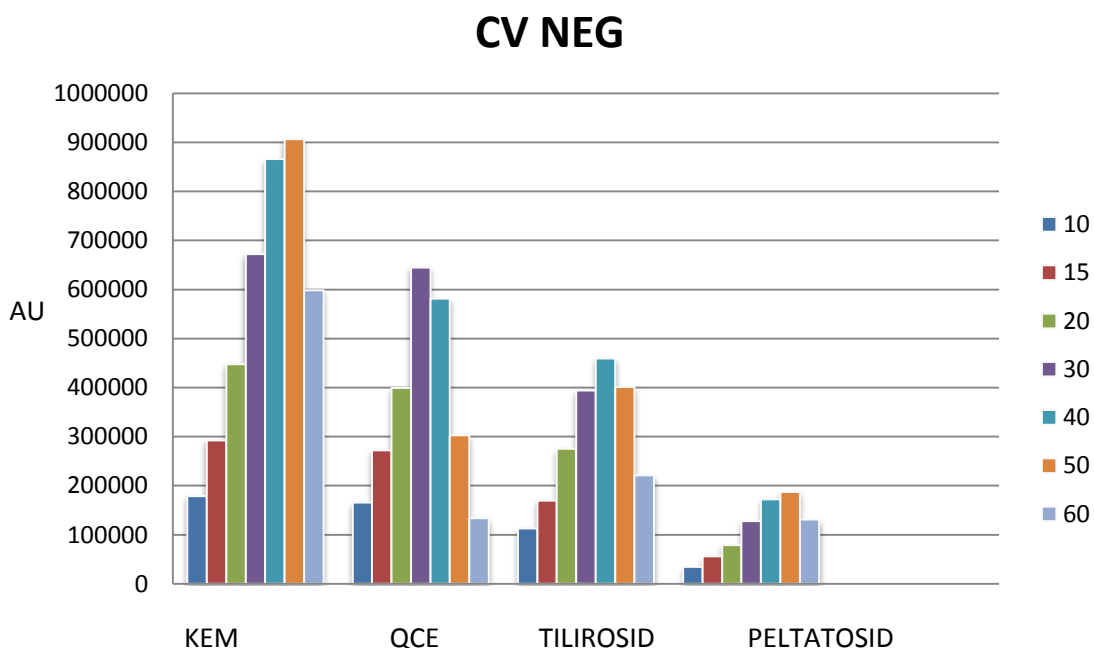


5.2.1 Optimalizácia MS a MS/MS podmienok pre referenčné štandardy

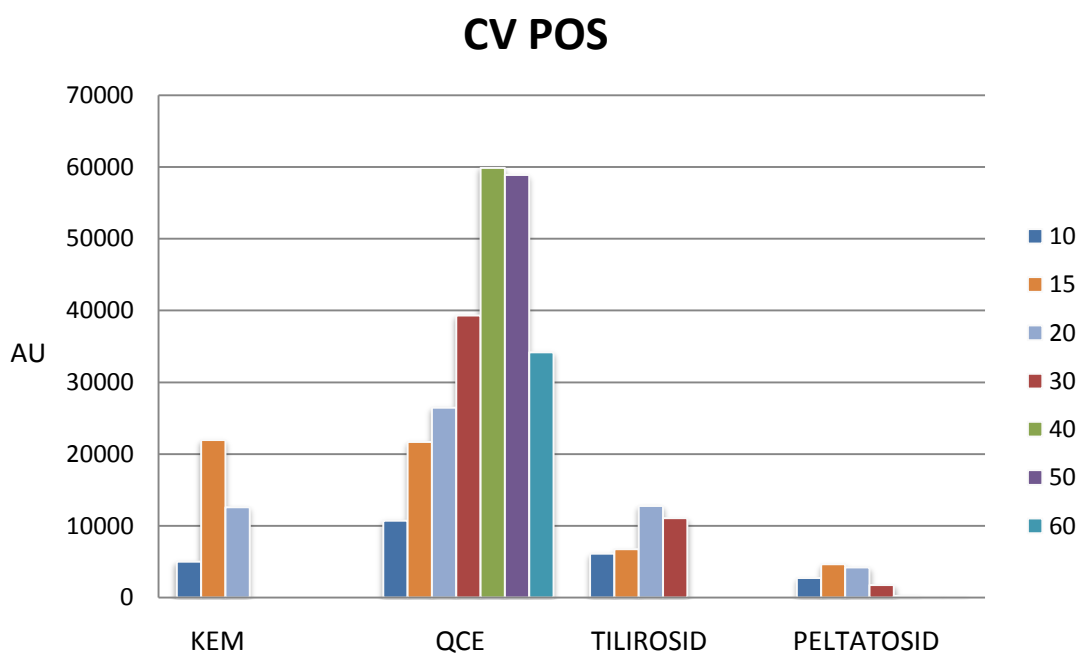
Optimalizované boli podmienky pre fragmentáciu s využitím niektorých dostupných štandardov. Skúšané bolo napätie na vstupnom kuželi (CV) v móde SIM v rozmedzí hodnôt 10 až 60 V pre štandardy kaempferol (KEM) a quercetín (QCE) ako zástupcov aglykonov v pozitívnom i negatívnom režime a určené boli aj pre ich deriváty peltatosid a tilirosid ako zástupcov glykosidov (Obr. 27 a 28). Využití boli zástupcovia z oboch

skupín, aglykonov a glykosidov, pretože tieto dve skupiny majú odlišné chovanie pri ionizácii i pri fragmentácii. Optimalizované boli hodnoty kolíznej energie v kolíznej cele. Tabuľka 8 popisuje použité napätie na vstupnom kuželi a kolíznú energiu pri fragmentácii KEM, QCE, peltatosidu a tilirosidu, pri ktorých dochádzalo k optimálnej fragmentácii.

Obr. 27: Optimalizácia napätia na vstupnom kuželi v negatívnom móde



Obr. 28: Optimalizácia napätia na vstupnom kuželi v pozitívnom móde



Tabuľka 8: Optimalizované napätie na vstupnom kuželi a kolízna energia

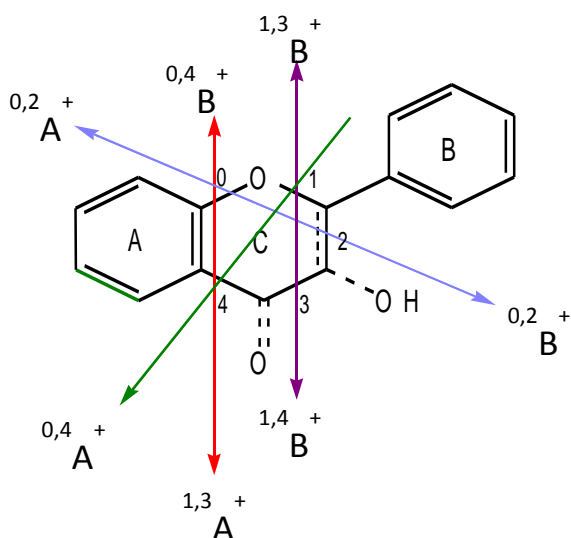
	POS			NEG			
	CV	KOLIZNA ENERGIA		CV	KOLIZNA ENERGIA		
KEM	15	25	30	50	30	40	50
QCE	40	25	30	30	30	40	50
TILIROSID	20	10	30	40	30	40	50
PELTATOSID	15	10	30	50	30	40	50

5.3 Meranie spektier charakteristických zástupcov s využitím štandardov

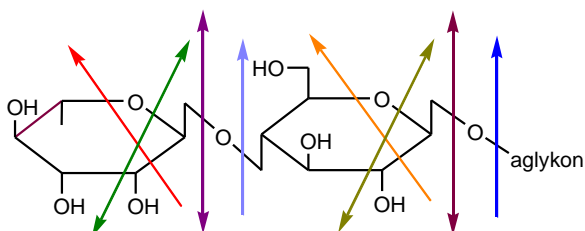
Fragmentácia kaempferolu a quercetínu

Základný princíp štiepenia flavonoidov všeobecne zobrazuje Obr. 29 [58]. Princíp fragmentácie glykosidov (glykosidickej zložky) približuje Obr. 30 [59].

Obr. 29: Základné princípy fragmentácie flavonoidnej štruktúry



Obr. 30: Fragmentácia glykosidickej zložky



Na zjednodušenie identifikácie derivátov kaempferolu a quercetínu boli vytvorené fragmentačné schémy štandardov kaempferolu a quercetínu pomocou nameraných dcérskych skenov a na porovnanie určených hlavných fragmentov a kresbu schém boli využité tieto literárne zdroje: [51, 58 - 64]. Najčastejšie fragmenty podľa tejto odbornej literatúry popisuje Tabuľka 9.

Tabuľka 9: Najčastejšie a najvýznamnejšie fragmenty z dostupnej literatúry

Flavonoid			
QCE		KEM	
ESI⁺	ESI⁻	ESI⁺	ESI⁻
127	107	127	107
137	121	121	135
149	151	133	151
153	179	153	163
165	229 (-CO ₂ -CO)	165	
229 (-H ₂ O - 2 CO)		213 (-H ₂ O - 2 CO)	
247 (-2CO)		231 (-2CO)	
257 (-H ₂ O, -CO)		245 (-C ₂ H ₂ O)	
275 (-CO)			
285 (-H ₂ O)			

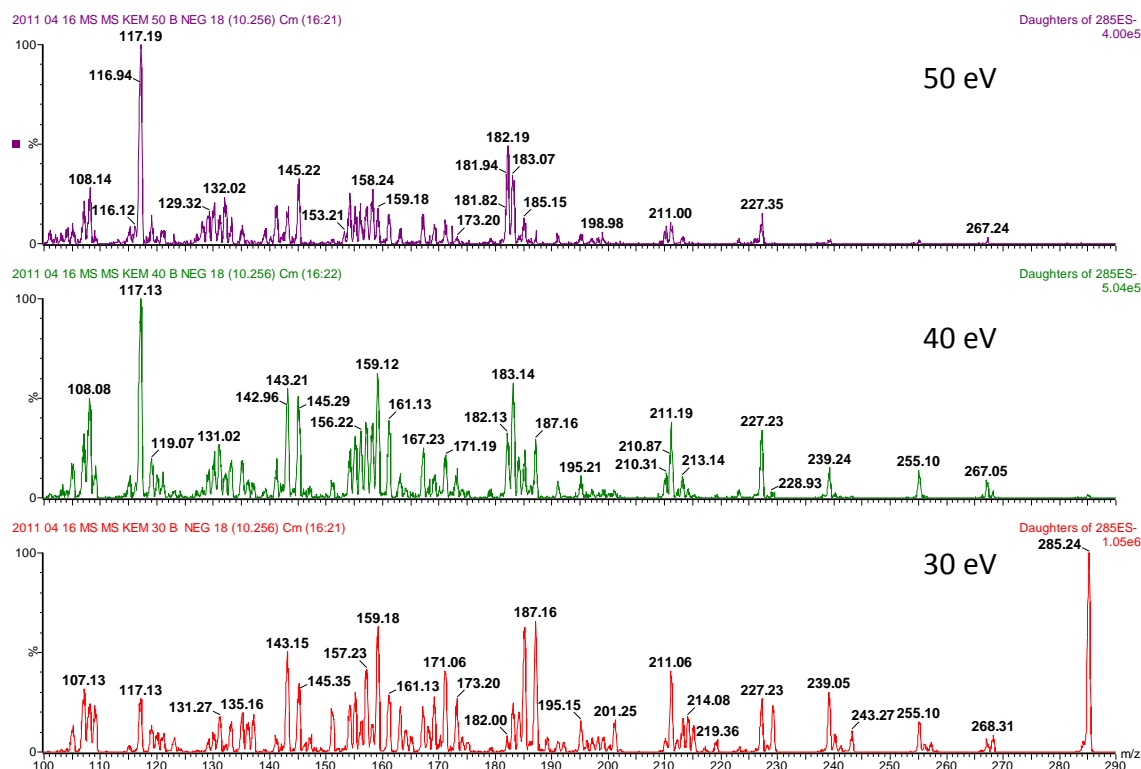
Skeny produktových iónov kaempferolu a quercetínu

Hmotnostné spektrá produktových iónov pre deprotonovaný kaempferol (m/z 285), získané pomocou kolíznej energie 30, 40 a 50 eV, sú zobrazené na Obr. 31. Fragmenty pre protonovanú molekulu kaempferolu (m/z 287) sú zobrazené na Obr. 32 pri použití kolíznej energie 25 a 30 eV. Pre quercetín boli v ESI⁻ (m/z 301) aj ESI⁺ (m/z 303) použité rovnaké kolízne energie ako pre kaempferol (Obr. 33 a 34).

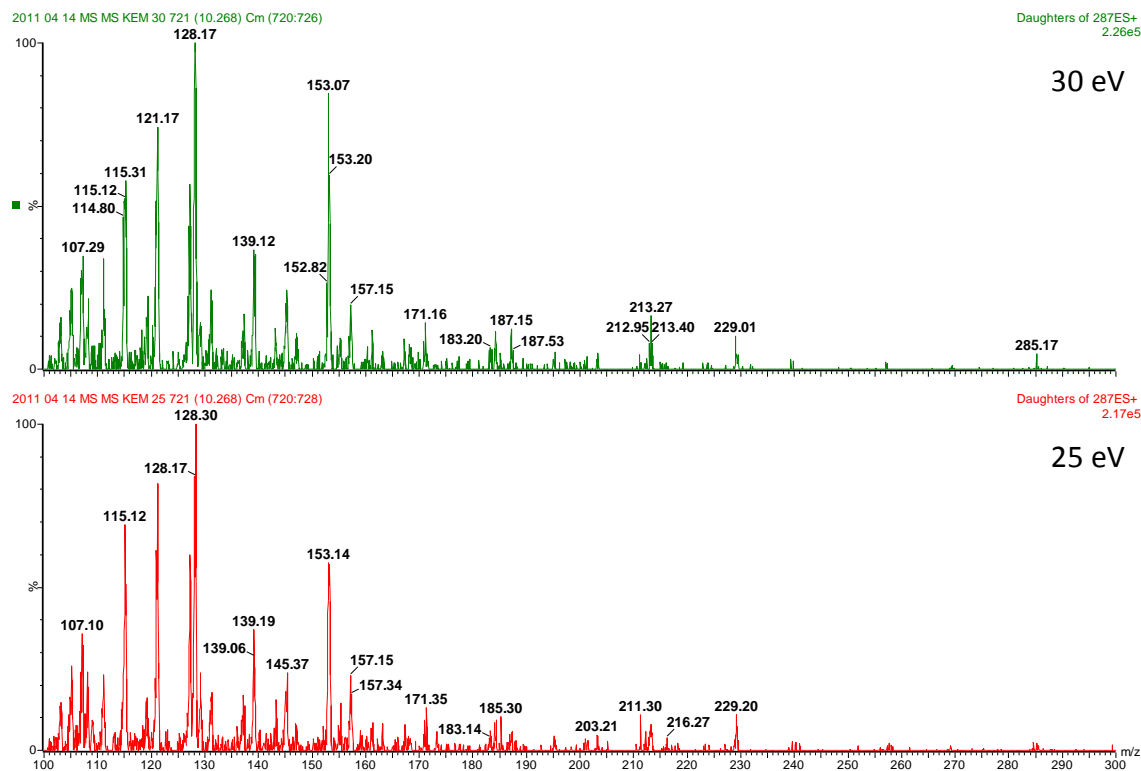
Rôzne kolízne energie boli použité preto, že pri každej z nich sa môžu získať iné typické fragmenty.

S pomocou získaných skenov produktových iónov a fragmentácií z dostupnej odbornej literatúry boli vytvorené návrhy fragmentačných schém pre kaempferol a quercetín v pozitívnom aj negatívnom režime (Obr. 35 - 38). Tieto skeny a fragmentačné schémy slúžia na uľahčenie potvrdenie identity aglykonov kaempferolu a quercetínu vo vzorke.

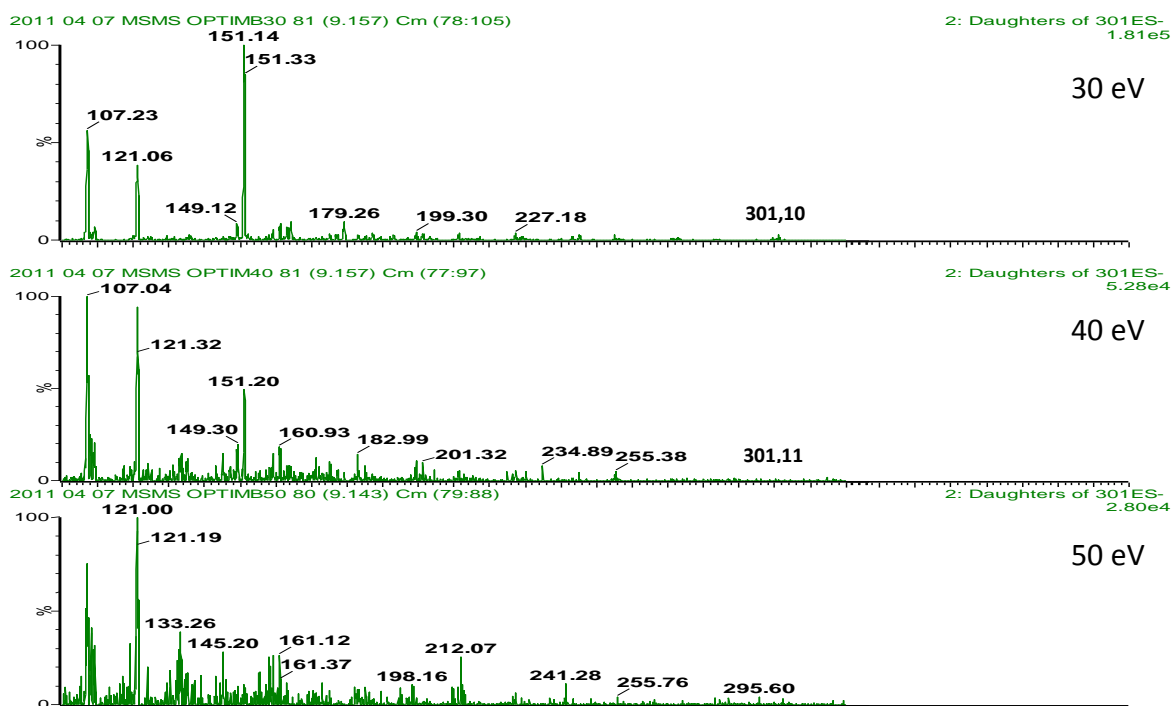
Obr. 31: Produktové ióny kaempferolu v negatívnom režime pri kolíznej energii 30, 40 a 50 eV



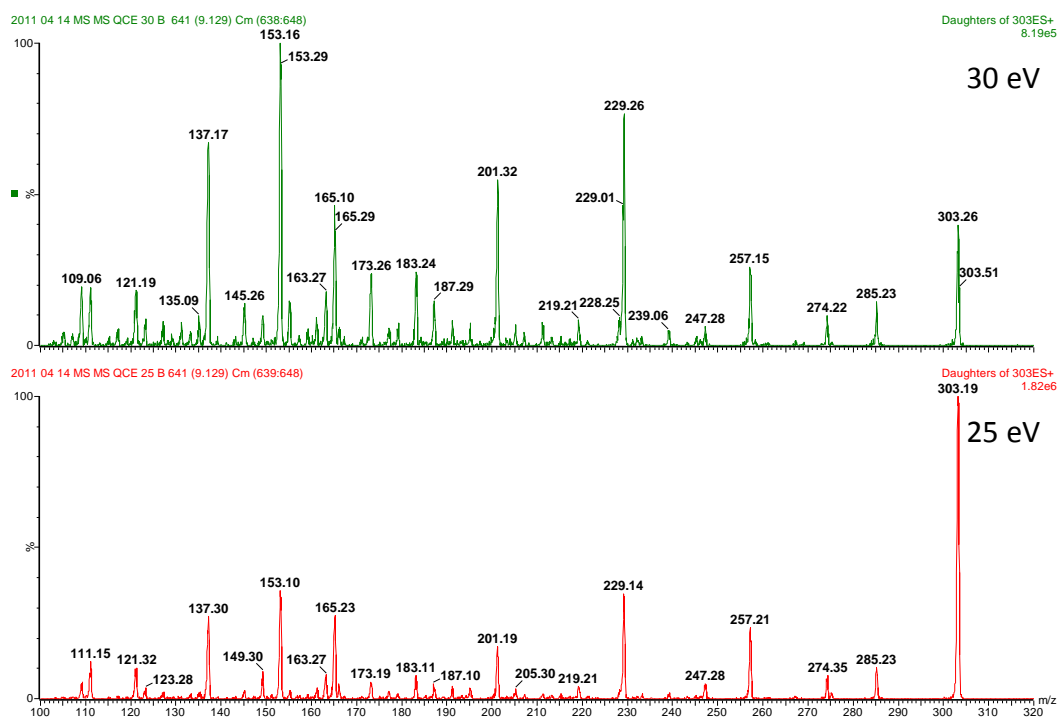
Obr. 32: Produktové ióny kaempferolu ESI⁺ pri kolíznych energiách 25 a 30 eV



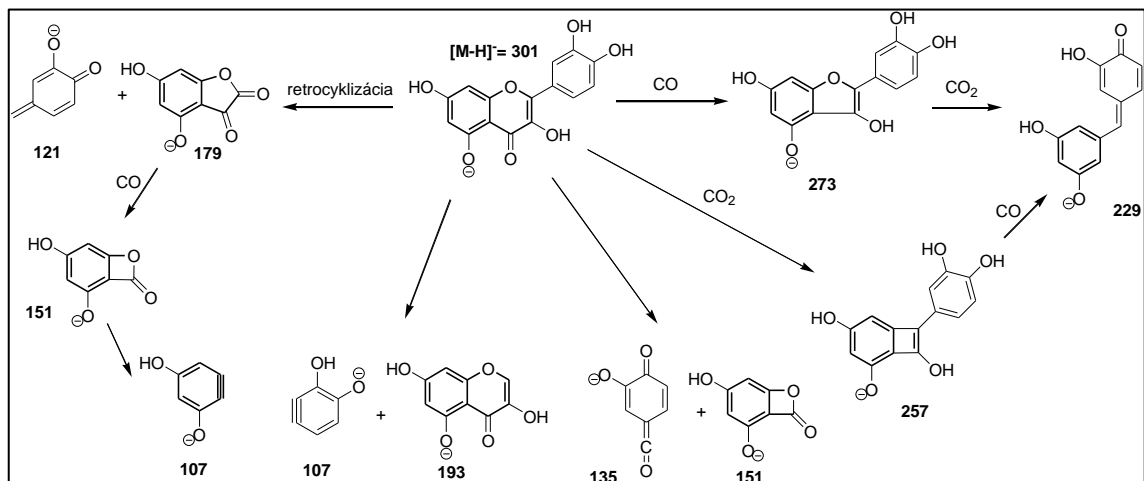
Obr. 33: Produktové skeny quercetínu v ESI pri kolíznych energiách 30, 40 a 50 eV



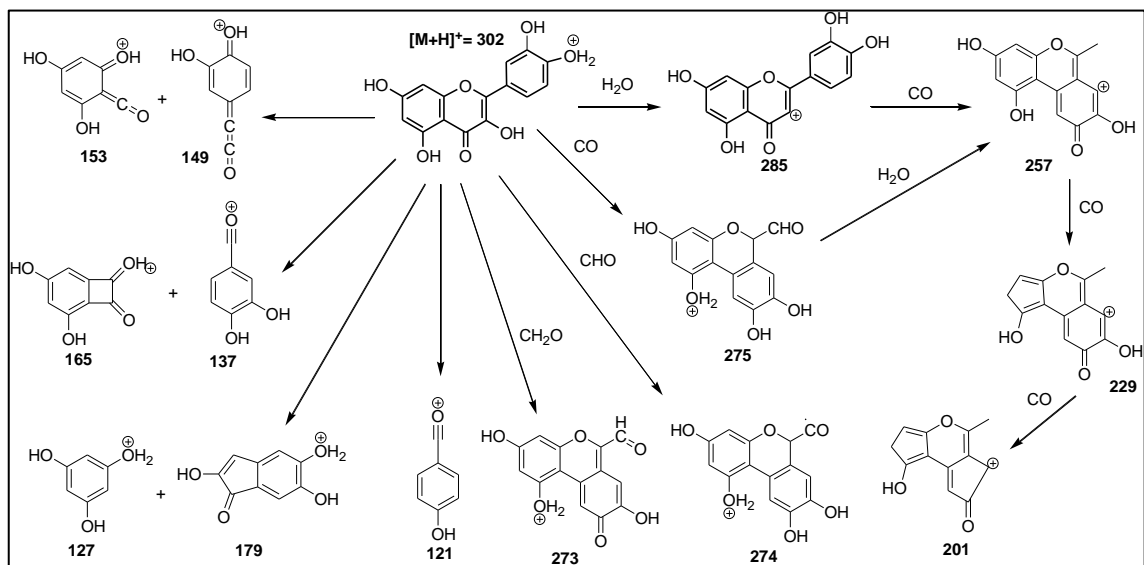
Obr. 34: Sken produktových iónov quercetínu v pozitívnom režime pri kolíznych energiách 25 a 30 eV



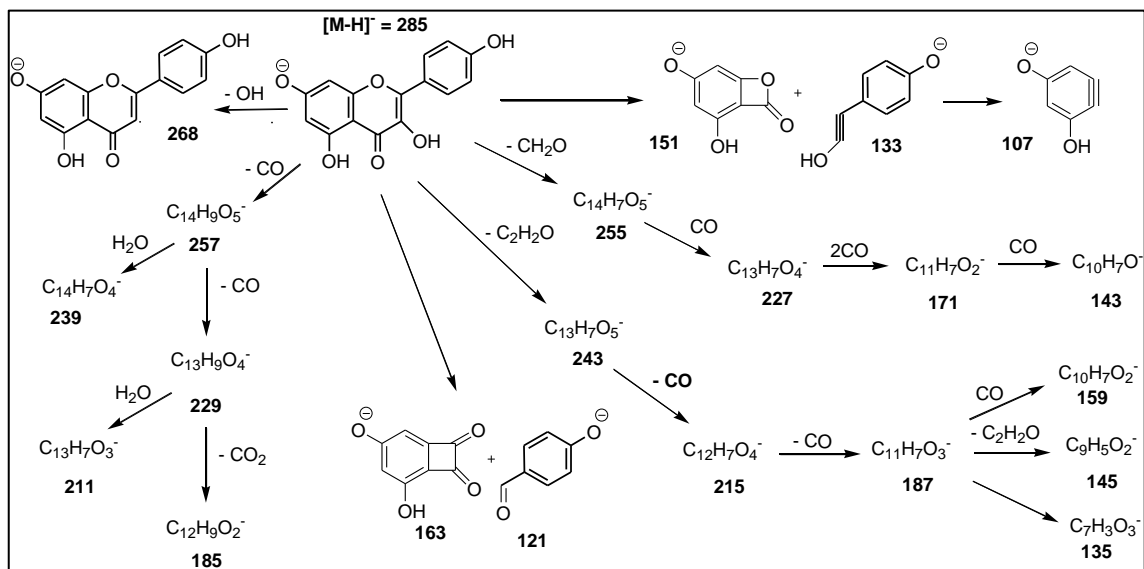
Obr. 35: Fragmentačná schéma guercetínu v ESI⁻



Obr. 36: Fragmentačná schéma quercetínu v ESI⁺



Obr. 37: Fragmentačná schéma kaempferolu v ESI⁻



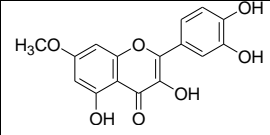
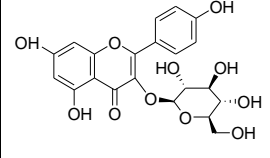
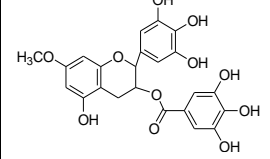
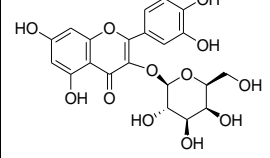
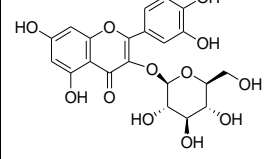
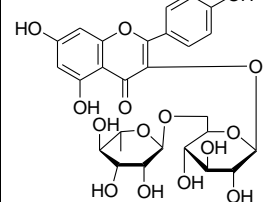
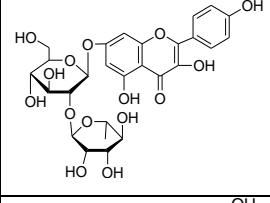
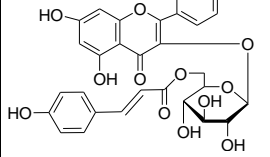
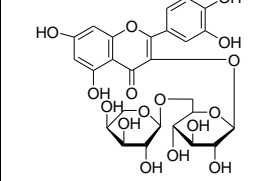
The diagram illustrates the fragmentation pathways of the $[M+H]^+$ ion (m/z 287) of a flavonoid. The precursor ion is shown at the top center, with various fragments branching out from it. The diagram is a complex network of chemical structures and arrows, illustrating the fragmentation behavior of the ion. Key pathways include losses of CO, H₂O, C₂H₂O, and C₂H₂O₂, as well as rearrangements and further fragmentation of the resulting ions. The diagram is a complex network of chemical structures and arrows, illustrating the fragmentation behavior of the ion.

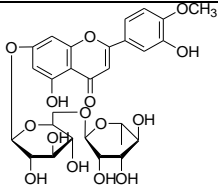
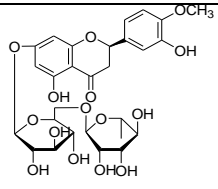
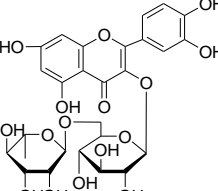
Meranie spektier štandardov

Bola prevedená kvalitatívna analýza referenčných štandardov. Dôvodom bolo získanie predstáv o fragmentácii a prípadná identifikácia zlúčenín zo vzorky pomocou t_R . K dispozícii bolo 20 štandardov zo skupiny fenolických látok, ako glykosidov, tak aglykonov. V Tabuľka 10 sú uvedené jednotlivé štandardy zoradené podľa molekulovej hmotnosti s uvedeným retenčným časom.

Tabuľka 10: Štandardy

MW	Názov	t_R	Sumárny vzorec	Štruktúra
228,24	RESVERATROL	7,48	$C_{14}H_{12}O_3$	
286,24	KAEMPFEROL	10,33	$C_{15}H_{10}O_6$	
286,24	LUTEOLÍN	9,3	$C_{15}H_{10}O_6$	
290,27	EPIKATECHÍN	3,87	$C_{15}H_{14}O_6$	
290,27	KATECHÍN	3,20	$C_{15}H_{14}O_6 \cdot xH_2O$	
302,28	HESPERETÍN	8,43	$C_{16}H_{14}O_6$	
302,24	QUERCETÍN	9,17	$C_{15}H_{10}O_7 \cdot xH_2O$	
306,27	EPIGALLOKATECHÍN	2,81/ 2,95	$C_{15}H_{14}O_7$	

316,26	RHAMNETÍN	10,08	$C_{16}H_{12}O_7$	
448,38	KAEMPFEROL-3- GLUCOSID	7,46	$C_{21}H_{20}O_{11}$	
458,37	EPIGALLOKATECHÍN GALLÁT	4,53	$C_{22}H_{18}O_{11}$	
464,38	HYPEROSID (Quercetín-3-galaktosid)	6,84	$C_{21}H_{20}O_{12}$	
464,38	ISOQUERCITRÍN (Quercetín-3-glukosid)	6,88	$C_{21}H_{20}O_{12}$	
594,52	KAEMPFEROL- RUTINOSID	7,25	$C_{27}H_{30}O_{15}$	
594,52	KAEMPFEROL- NEOHESPERIDOSID	6,88	$C_{27}H_{30}O_{15}$	
594,53	TILIROSID (Kaempferol-3-(kumaroyl) glukosid)	9,37	$C_{30}H_{26}O_{13}$	
596,50	PELTATOSID (Quercetín-3- arabinoglukosid)	6,14	$C_{26}H_{28}O_{16}$	

608,54	DIOSMÍN (Diosmetín- neohesperitosid)	6,67	$C_{28}H_{32}O_{15}$	
610,56	HESPERIDÍN (Hesperetín- neohesperidosid)	5,7	$C_{28}H_{34}O_{15}$	
610,52	RUTÍN (Quercetín-rutinosid)	6,72	$C_{27}H_{30}O_{16} \cdot xH_2O$	

Chemické vzorce štandardov boli v práci prebraté zo zdrojov [65] a [66].

5.4 Meranie vzorky zo suchého lyofilizovaného vodného extraktu z listov *Fragaria vesca* L

Hmotnostné spektrá jednotlivých pík

V základných MS spektrách (full scan) bola pozorovaná slabá fragmentácia, kde $[M + H]^+$ alebo $[M - H]^-$ ióny sú hlavné píky v pozitívnom alebo negatívnom režime.

Pri nízkych kolíznych energiách (10 - 20 eV) dochádza vo väčšine prípadov k slabšej fragmentácii molekuly. Záznam spektra získaný pri vysokej kolíznej energii (25 - 40 eV) obsahuje väčšie množstvo fragmentov [43].

Z hmotnostnej spektrometrie je možné získať informácie o molekulovej hmotnosti a štruktúrnej charakteristike cieľových látok. Vzhľadom k tomu, že mäkké ionizačné techniky, ako je ESI alebo APCI, vytvárajú hlavne protonované (v pozitívnom režime) a deprotonované molekuly (v negatívnom režime), je potrebné podrobnejšie informácie o štruktúre flavonoidov získať tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS/MS) v kombinácii s kolízne indukovanou disociáciou (CID) [43].

Po vyhodnotení základných spektrierv móde MS boli určené molekulové hmotnosti a prekursori, ktoré boli ďalej podrobené MS/MS analýze.

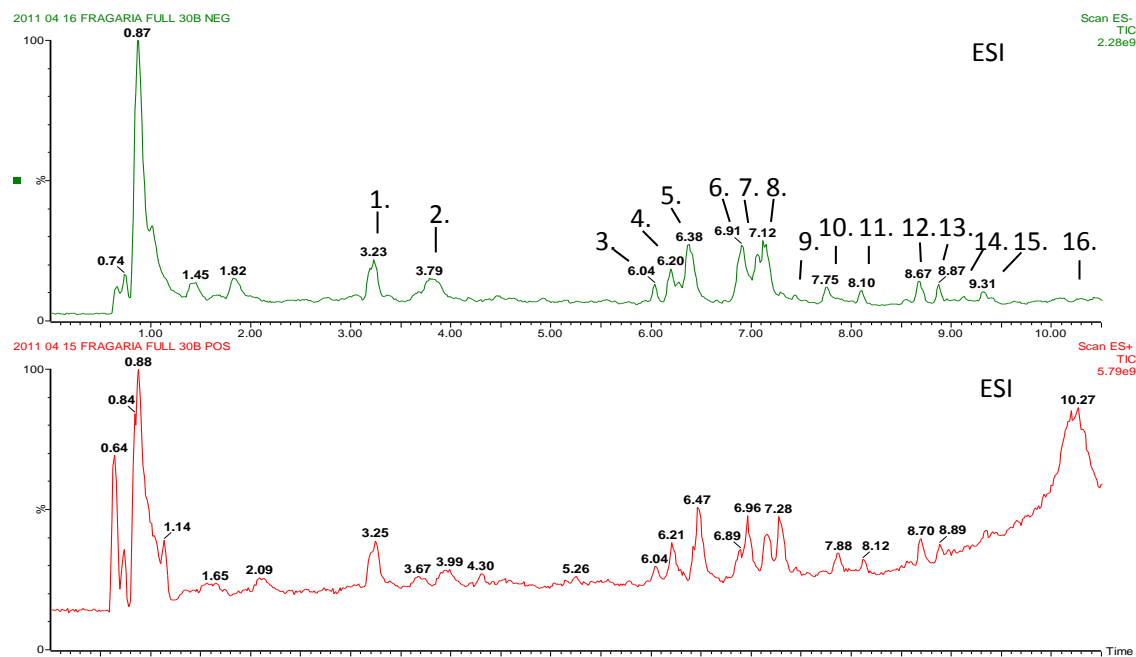
Prvým krokom bolo odmeranie skenov produktových iónov, kde bol prekursorový ión podrobený kolízii s kolíznym plynom a boli sledované produktové spektrá pri rôznych hodnotách kolíznej energie. Boli porovnané spektrá typických štandardov a vzorky.

S ohľadom na štrukturálne charakteristiky flavonoidov, je možné získať informácie o aglykóne, typoch sacharidov (mono-, di-, tri- alebo tetrasaccharidy a hexóza, deoxyhexóza alebo pentóza) alebo iných substituentoch, o poradí cukrových zložiek, interglykosidických väzbách a o väzbových miestach substituentov na aglykone. Avšak, nie je možné úplne definovať štruktúru týchto zlúčenín samotným MS, pretože existuje mnoho izomérnych štruktúr [43]. Druhou prekážkou je nedostatočne presne meraná molekulová hmotnosť len s využitím kvadrupólových analyzátorov. Tento problém je možné prekonať použitím hmotnostného spektrometra s vysokým rozlíšením (HRMS), ktorý meria presnú hmotu.

Chromatogram vzorky

Bola prevedená kvalitatívna analýza vzorky. Spektrá sú zaradené podľa poradia pík v chromatograme vzorky. Prvý pík s t_R 0,67 odpovedal mŕtvemu retenčnému času, preto nie je v práci zahrnutý. Píky s t_R 0,10 a t_R 0,87 pochádzajú z mobilnej fázy. Boli porovnávané chromatogramy a spektrá vzorky a štandardov, aby bola overená prítomnosť štandardných látok vo vzorke a bolo zistené, ktoré ďalšie fenolické látky sa vo vzorke nachádzajú. Na prvý pohľad obsahoval chromatogram vzorky približne 14 pík, ale mnohé píky obsahovali viacej látok a ďalšie neboli viditeľné, lebo sa stratili v šume, práve tie boli identifikované pomocou RIC a ďalších skenov (Obr. 39). Výsledky zhrňuje Tabuľka 12 na konci kapitoly.

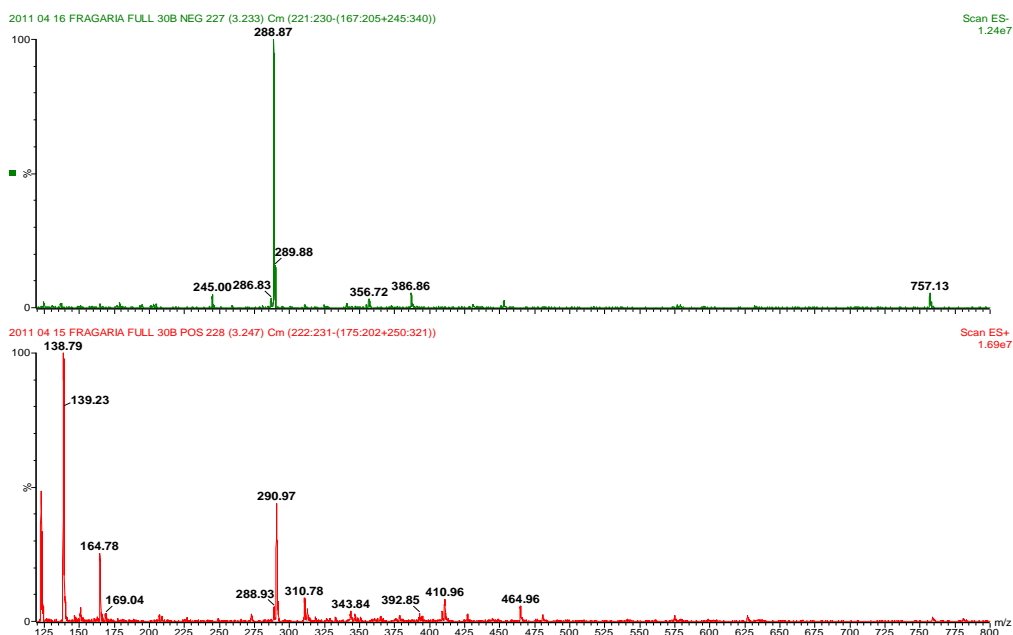
Obr. 39: Chromatogram vzorky s označenými píkmi (ESI/ESI⁺)



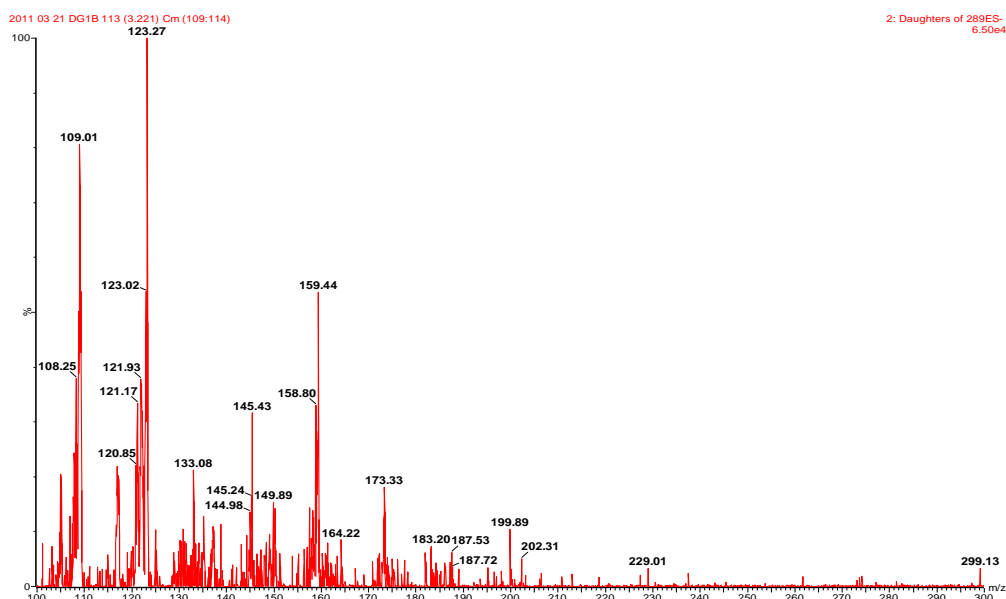
Pík 1 $t_R = 3,23$

Základné spektrum píku s retenčným časom 3,23 min obsahoval ako hlavný ión m/z 289 v negatívnom režime a m/z 291 v pozitívnom režime (Obr. 40). Podľa retenčného času a molekulovej hmotnosti látka zo vzorky zodpovedá katechínu, čo potvrdili aj porovnané fragmentačné schémy v negatívnom režime (Obr. 41, MS/MS spektrum štandardu katechíni viz príloha 8.4).

Obr. 40: Spektrá vzorky s $t_R = 3,23$ s nájdenou molekulovou hmotnosťou 290



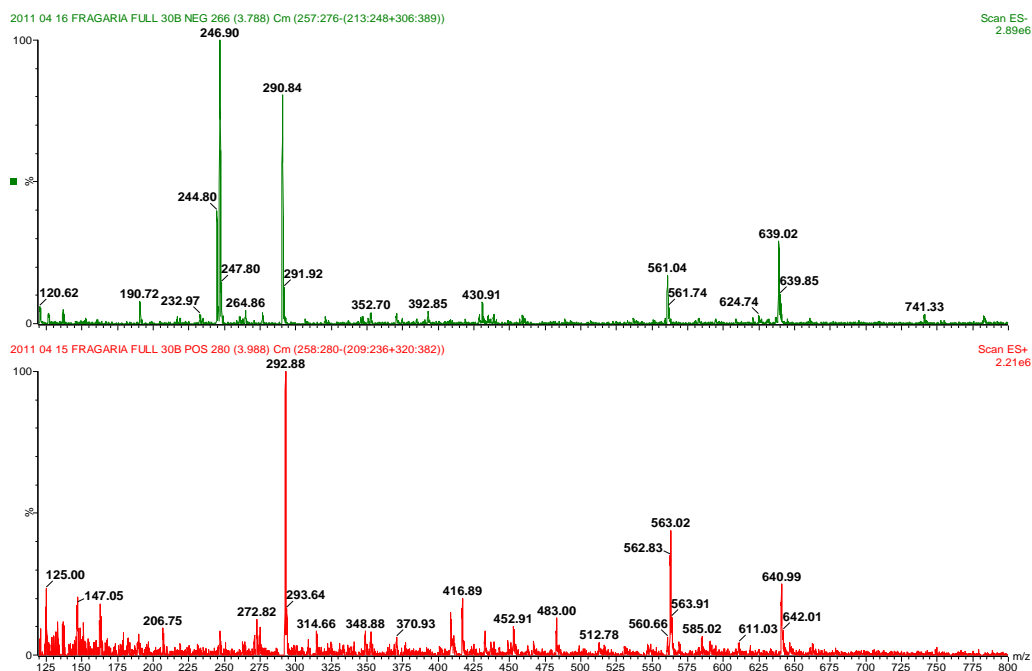
Obr. 41: Spektrum fragmentácie vzorky m/z 289 v ESI⁺



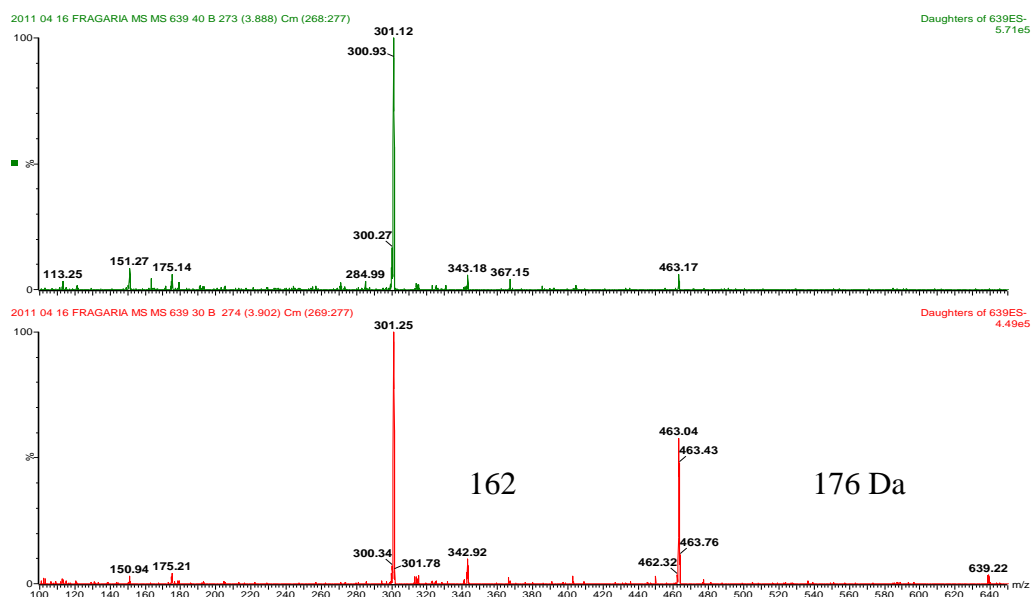
Pík 2 $t_R = 3,8$

Pík 2 (Obr. 42) obsahuje ako hlavné molekulové ióny v negatívnom režime deprotonované molekuly o m/z 291 a 639. V pozitívnom spektre sa nachádzali protonované molekuly o m/z 293, m/z 465 a m/z 641. Prvému a tretiemu molekulovému iónu odpovedali adukty so sodíkom o m/z 315 respektíve 663. Predpokladaná strata pre protonizovanú molekulu m/z 465 je 162, čo je pravdepodobne hexóza a aglykon quercetín.

Obr. 42: Základný MS sken pre $t_R = 3,8$ (ESI/ESI⁺)

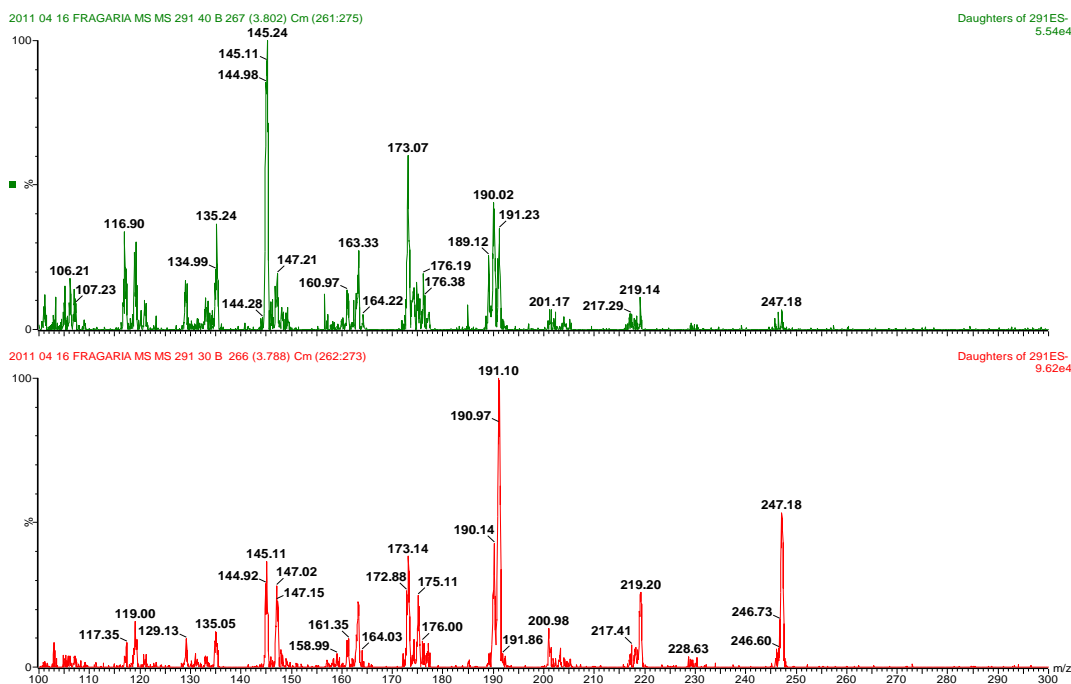


Obr. 43: Fragmentačné spektrá vzorky hodnoty m/z 639 pri kolíznych energiách 30 a 40 eV v ESI⁺



Fragmentačné spektrá vzorky hodnoty m/z 639 pri kolíznych energiách 30 a 40 eV, obsahovali straty 176 a následne 162 Da (Obr. 43). Látka s molekulovou hmotnosťou 640 bola podľa toho predbežne identifikovaná ako quercetín-hexosid-glukuronid alebo quercetín-feruloyl-hexosid. Štruktúru molekuly s MW 292 sa nám nepodarilo určiť ani pomocou fragmentačných spektier v negatívnom režime pri kolíznych energiách 30 a 40 eV (Obr. 44).

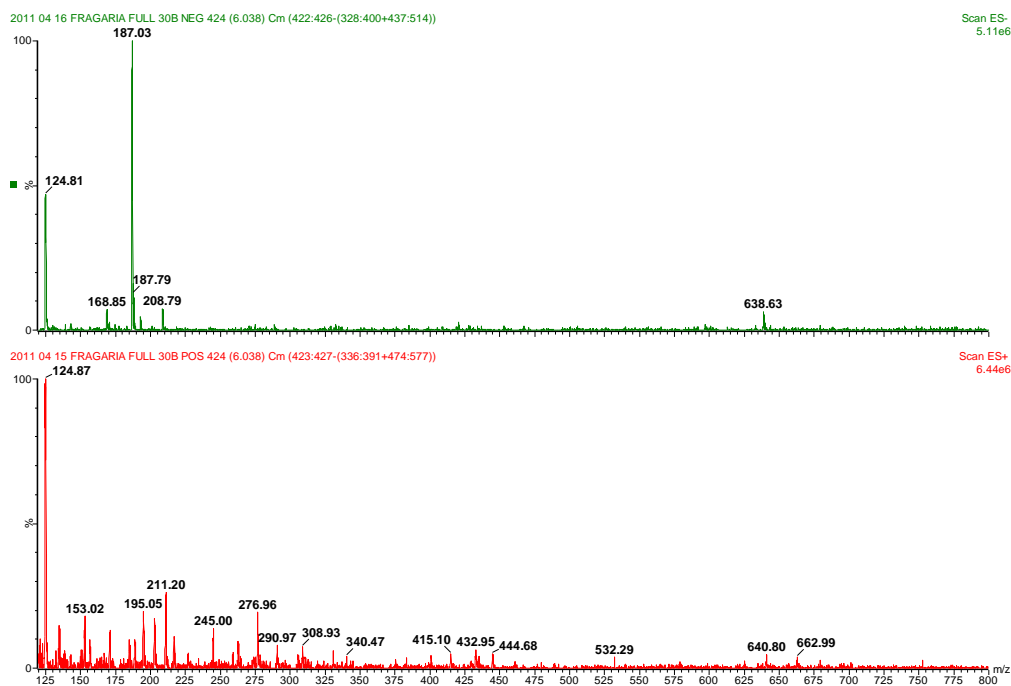
Obr. 44: Fragmentačné spektrá vzorky pre m/z 291 pri kolíznych energiách 30 a 40 eV



Pík 3 $t_R = 6,05$

Aj napriek tomu, že pík 3 bol dobre viditeľný na základných spektrách vzorky v pozitívnom aj negatívnom režime, jeho vlastné spektrá neodhalili žiadne indície vedúce k identifikácii (Obr. 45).

Obr. 45: Základné spektrum vzorky píku 3 s $t_R = 6,05$ (ESI/ESI⁺)

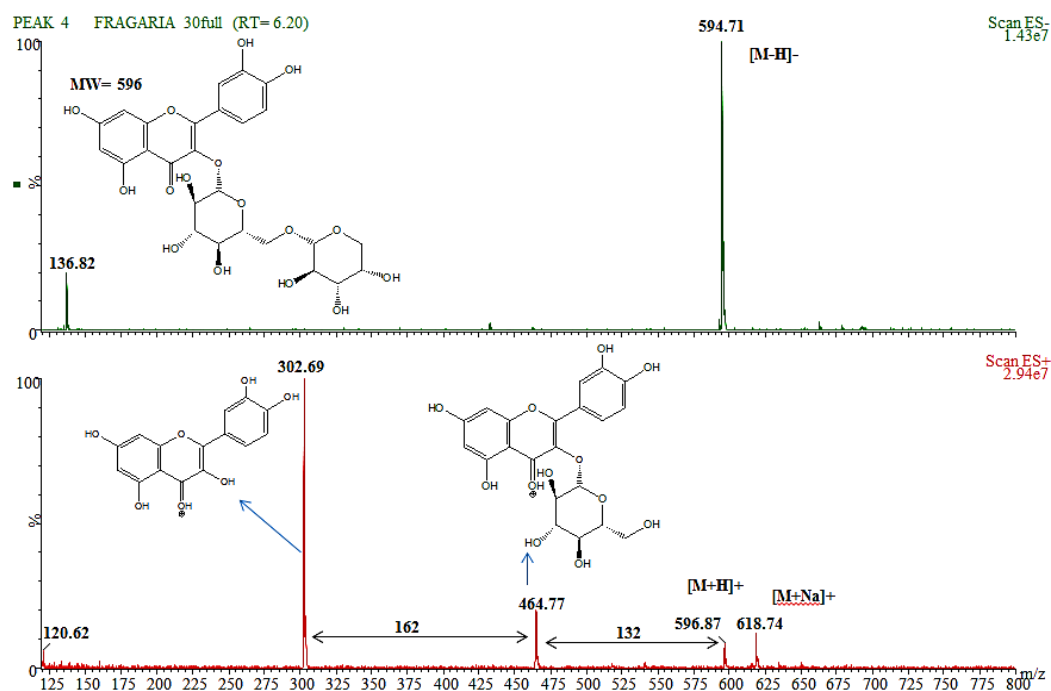


Pík 4 $t_R = 6,20$

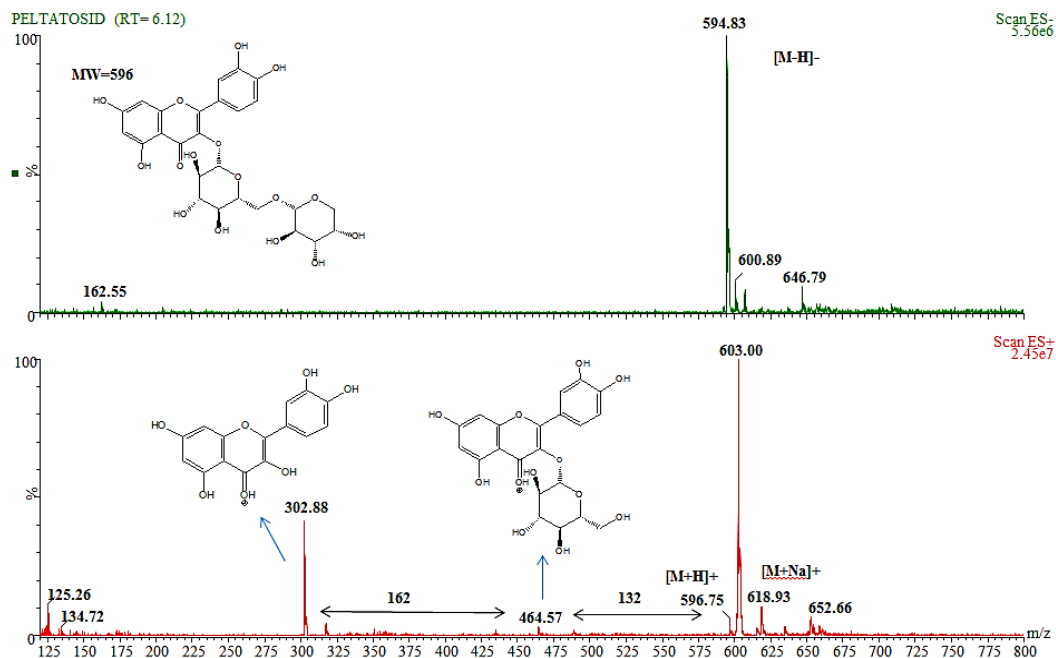
V píku 4 (Obr. 46) je hlavný protonovaný ión o m/z 596 podporený $[M+Na]^+ = 619$. Druhým výrazným fragmentom je ión o m/z 465 a aglykon s m/z 303. V negatíve je hlavný deprotonovaný molekulový ión s m/z 595.

Základné spektrum píku 4 je shodné so spektrom štandardu peltatosidu (Obr. 47), čo potvrdzujú aj fragmentačné spektrá (Obr. 48, MS/MS spektrá štandardu peltatosidu viz príloha 8.4) a spektrá neutrálnych strát (Obr. 49). Neutrálna strata 294 Da predstavuje disacharid arabinoglukosid. Látka s molekulovou hmotnosťou 464 môže byť fragment peltatosidu a / alebo samostatná zlúčenina so štruktúrou quercetín-hexosid.

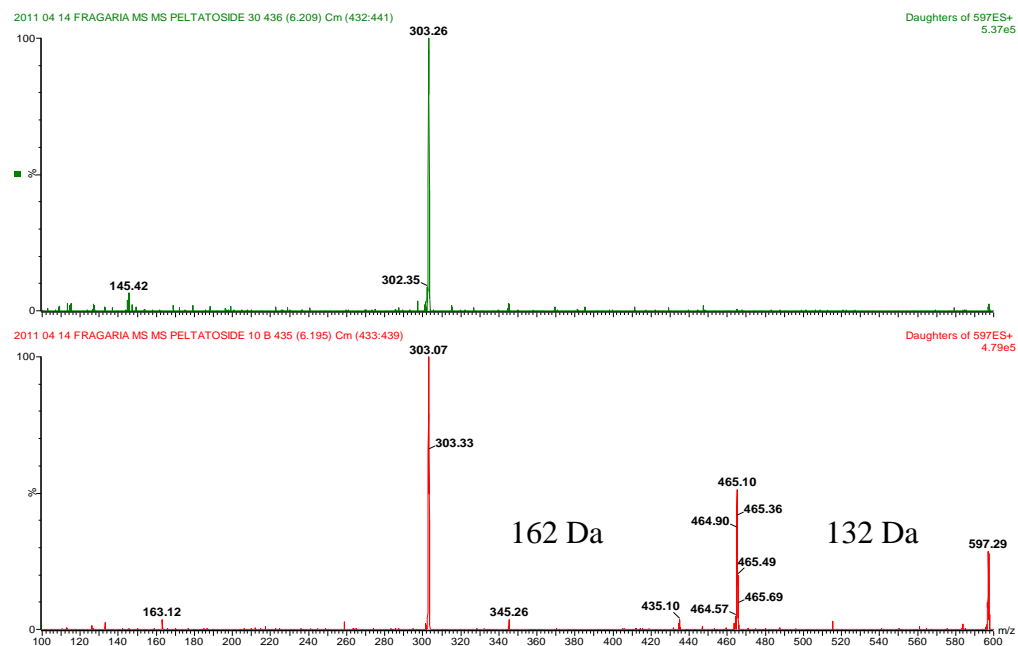
Obr. 46: MS spektrum vzorky s $t_R = 6,2$ so vzorcom peltatosidu a predpokladaných fragmentov



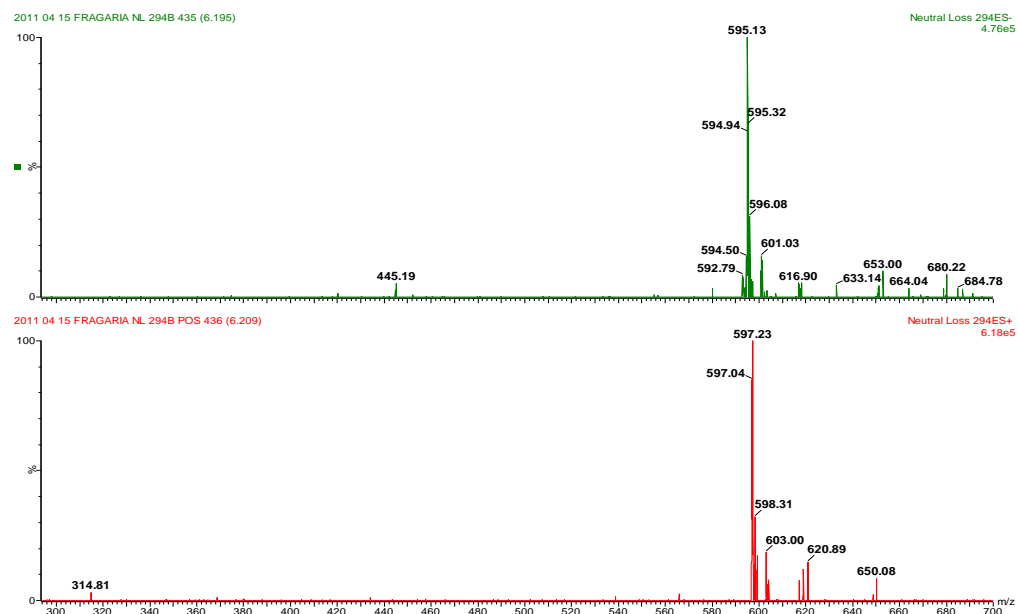
Obr. 47: Spektrum štandardu peltatosidu so vzorcom a fragmentami



Obr. 48: Fragmentačné spektrá pre hodnotu m/z 597 v ESI⁺ pri kolíznych energiách 10 a 30 eV



Obr. 49: Spektrá neutrálnych strát 294 Da pre vzorku v $t_R = 6,2$

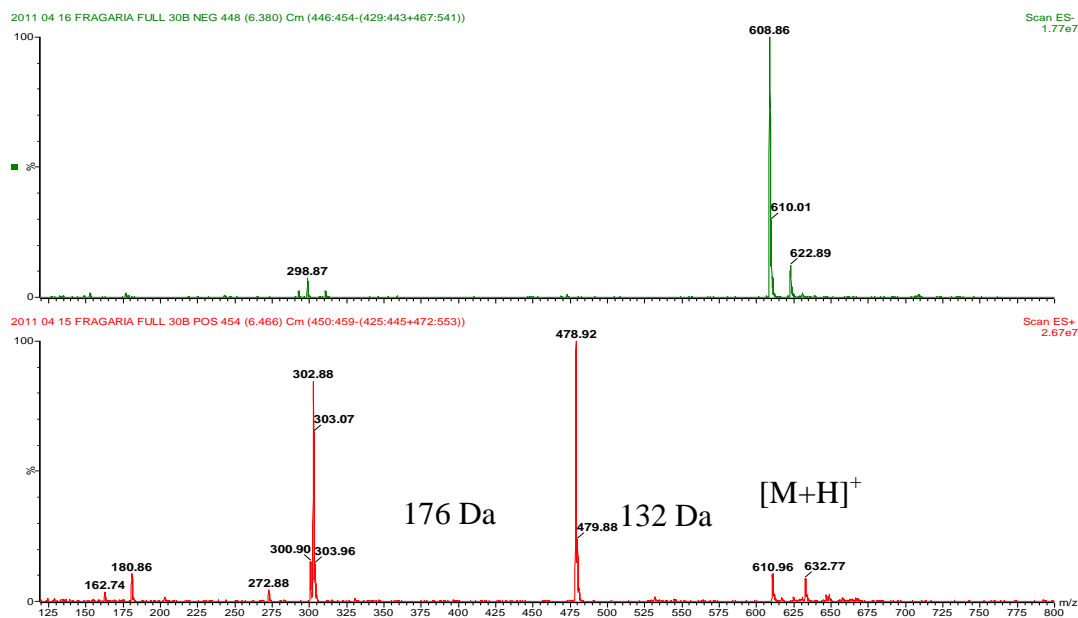


Pík 5 $t_R = 6,38$

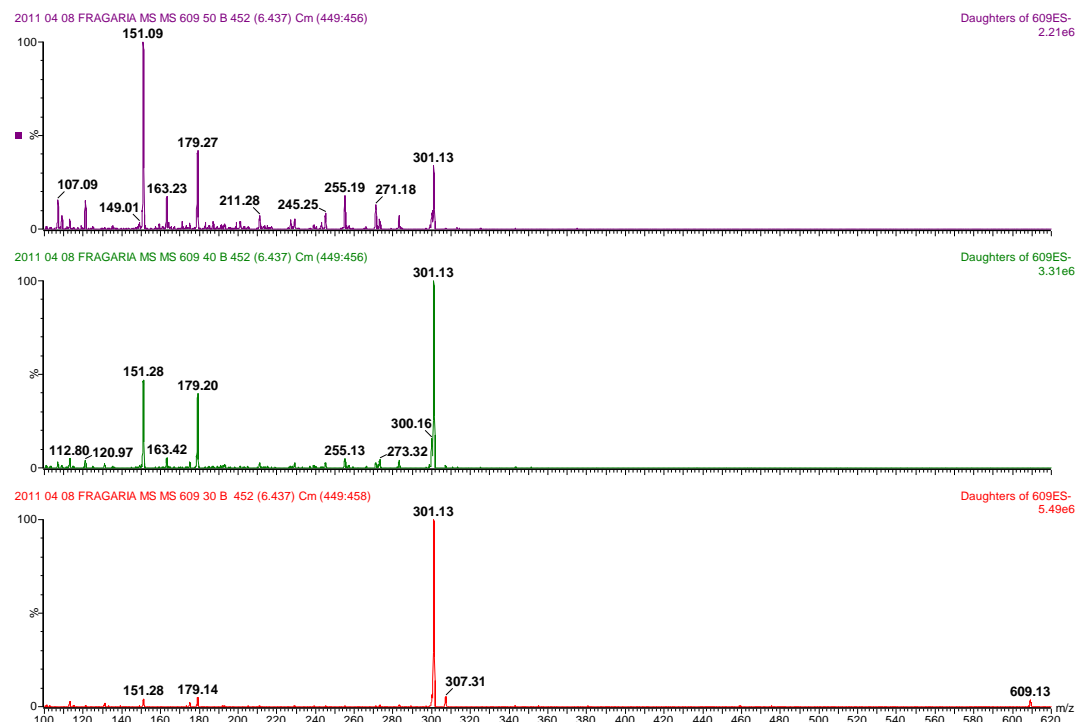
Hlavný protonovaný ión v píku 5 v pozitívnom režime má hodnotu m/z 611 a je sprevádzaný $[M+Na]^+ = 632$. Ďalšie výrazné ióny sú s hodnotou m/z 479 a 303. V negatívnom režime je hlavný deprotonovaný ión s m/z 609. Identifikovali sme v píku (Obr. 50) zlúčeninu s molekulovou hmotnosťou 610, ktorá nie je rutín, pretože sa nezhodujú retenčné časy a ani fragmentačné spektrá (Obr. 51, Obr. 52, MS/MS spektrá

štandardu viz príloha 8.4). Štruktúru bola predbežne určená podľa fragmentačných spektier a spektier neutrálnych strát (Obr. 53) ako quercetín-glukurono-pentosid alebo QCE-feruloyl-pentosid.

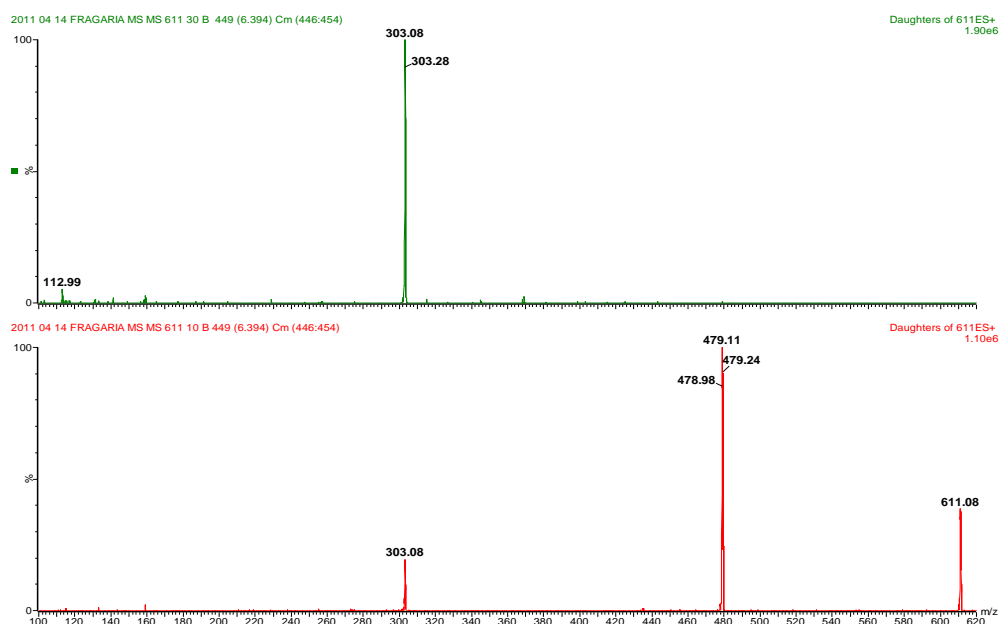
Obr. 50: Spektrum vzorky s $t_R = 6,42$



Obr. 51: Fragmentačné spektrá pre m/z 609 v ESI pri kolíznej energii 30, 40 a 50 eV



Obr. 52: Fragmentačné spektrá pre hodnotu m/z 611 v ESI⁺ pri kolíznych energiách 10 a 30 eV



Obr. 53: Spektrum neutrálnej straty 308 v t_R 6,42

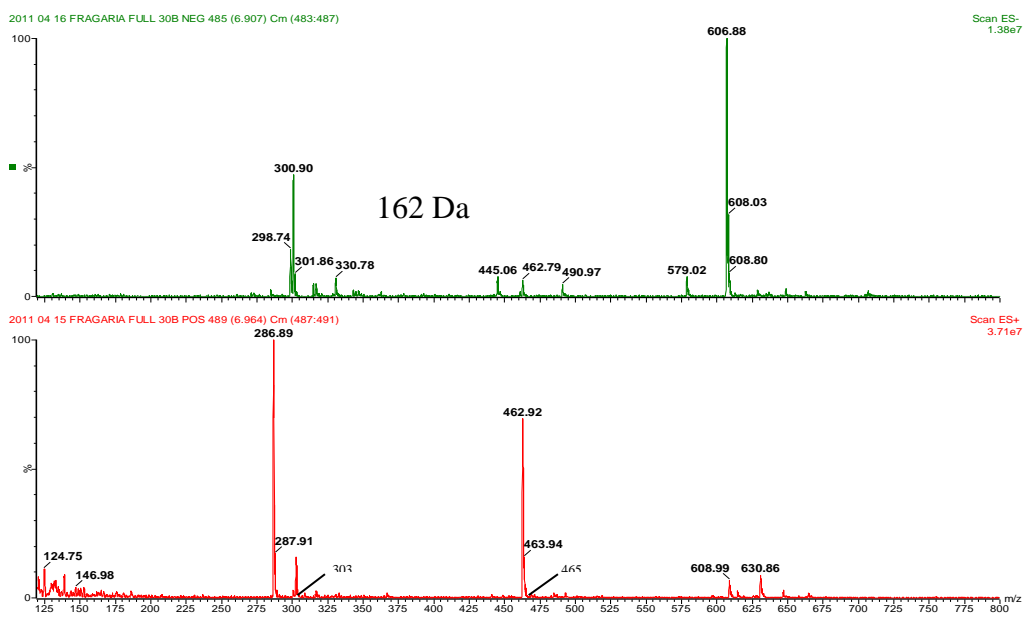


Pík 6 t_R = 6,92

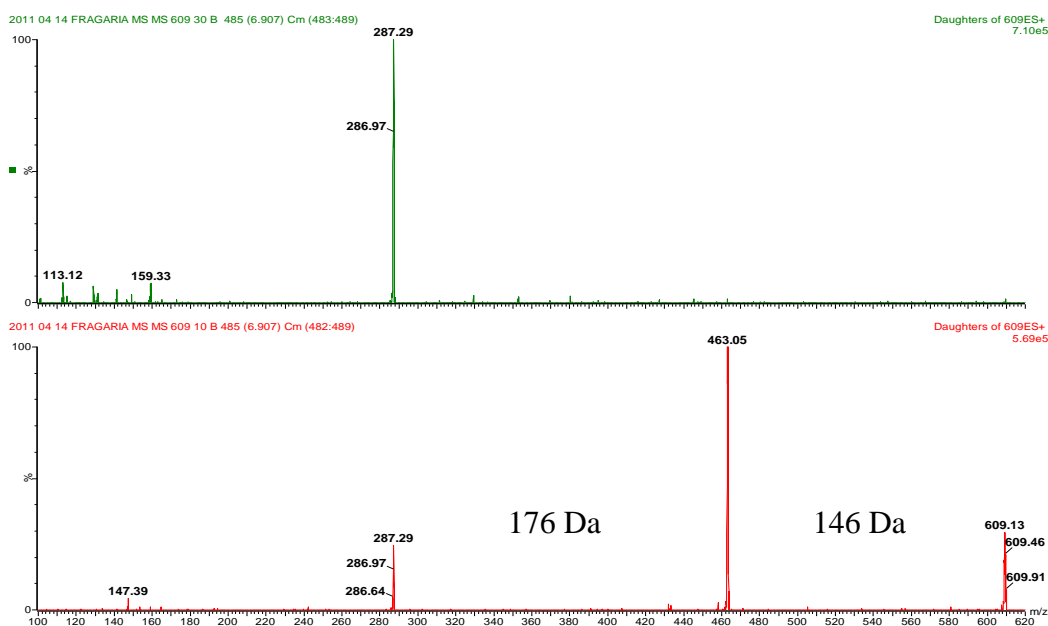
Spektrum je zmesné, čo znamená že ide o koelúciu látok. Hlavným molekulovým iónom píku s retenčným časom 6,92 min v pozitívnom režime je ión s m/z 609. Pozorovateľný je aj jeho adukt so sodíkom (m/z 631), a ióny s m/z 463, 303 a 287. V negatívnom spektre sú hlavné molekulový ión m/z 607 a 301, preukázateľný je aj ión s m/z 463 (Obr. 54). Zlúčenina s molekulovou hmotnosťou 608 nebola plne identifikovaná, ale podľa fragmentačných spektier (Obr. 55) ide o derivát kaempferolu s naviazaným pravdepodobne glukurono-rhamnosidom alebo feruloyl-rhamnosidom.

Zlúčenina s molekulovou hmotnosťou 462 je pravdepodobne fragment zlúčeniny 608 a bola predbežne určená ako kaempferol-glukuronid podľa fragmentačných spektier (Obr. 57). Látka s molekulovou hmotnosťou 464 má zhodné fragmentačné spektrum i retenčný čas so štandardom isokvercitrínom (Obr. 56, produktové spektrá pre štandard sa nachádzajú v prílohe 8.4) a zhodnú neutrálnu stratu 162 v pozitívnom i negatívnom režime (Obr. 58). Jedná sa teda o isokvercitrín.

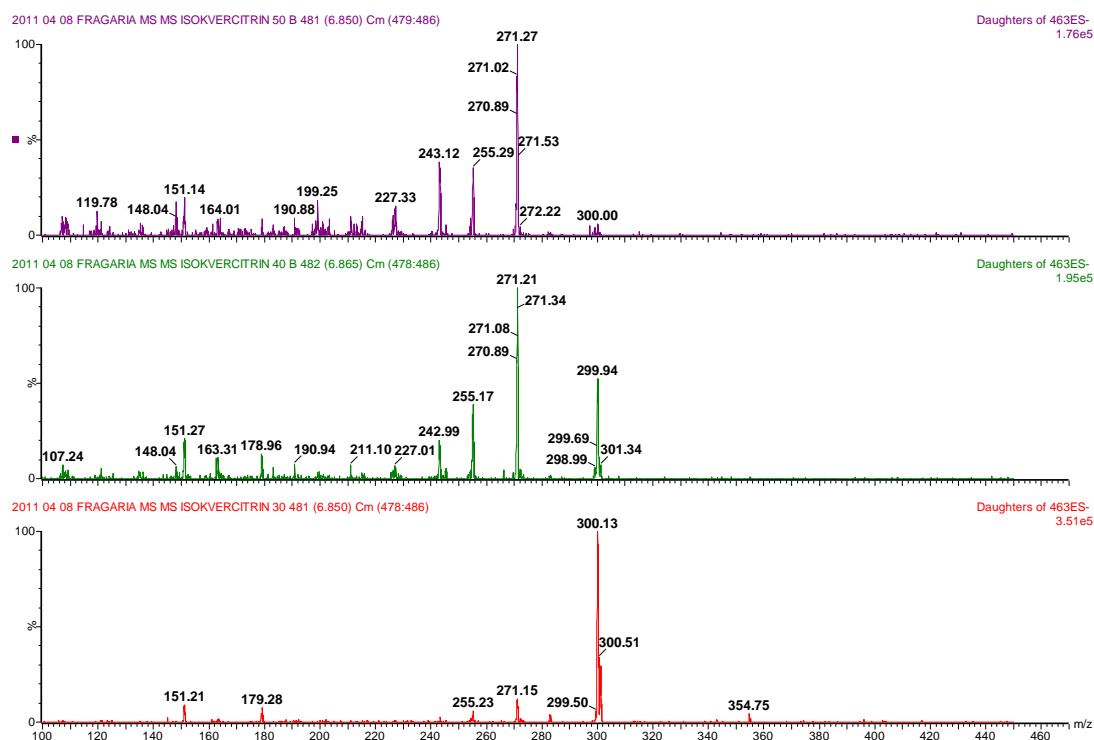
Obr. 54: Základné spektrum vzorky s $t_R = 6,92$



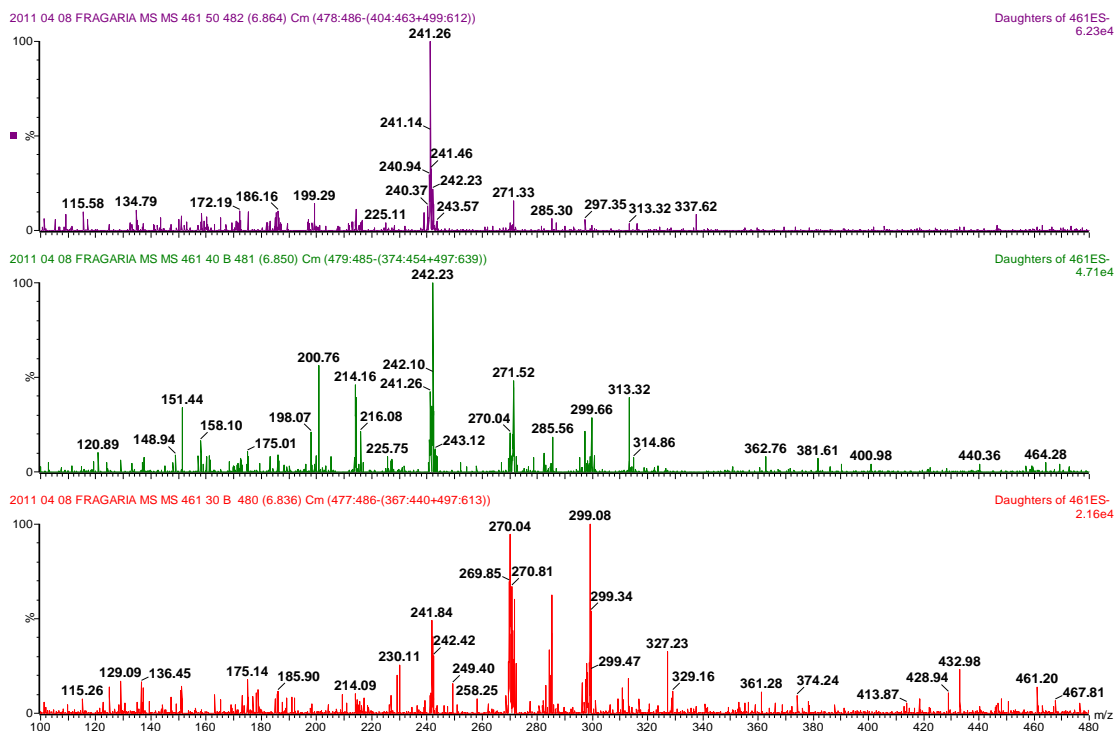
Obr. 55: Fragmentačné spektrá pre hodnotu m/z 609 v ESI⁺ pri kolíznej energii 10 a 30 eV



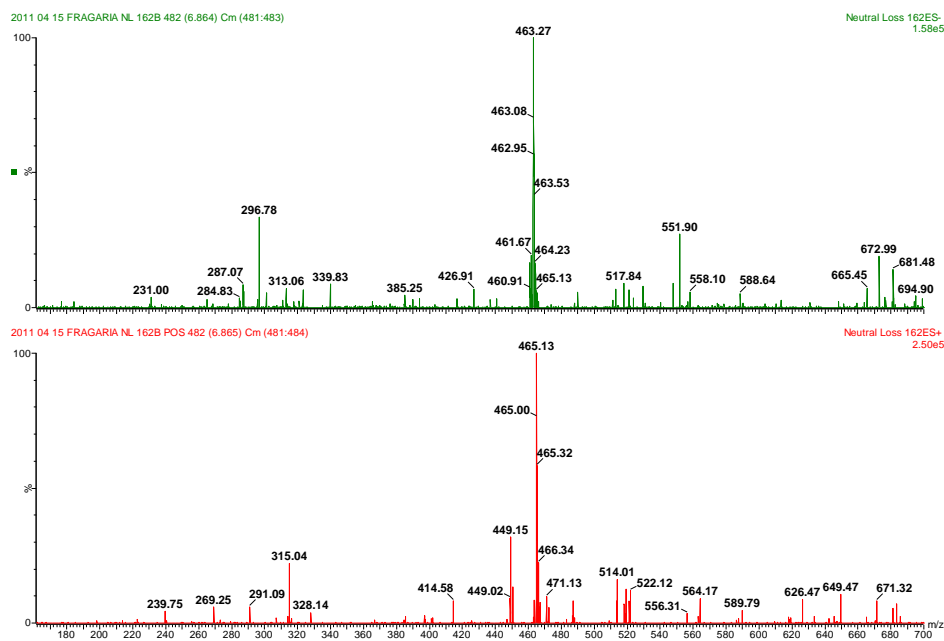
Obr. 56: Fragmentačné spektrá pre m/z 463 v ESI pri kolíznych energiách 30, 40 a 50 eV



Obr. 57: Fragmentačné spektrá pre m/z 461 v ESI pri kolíznych energiách 30, 40 a 50 eV



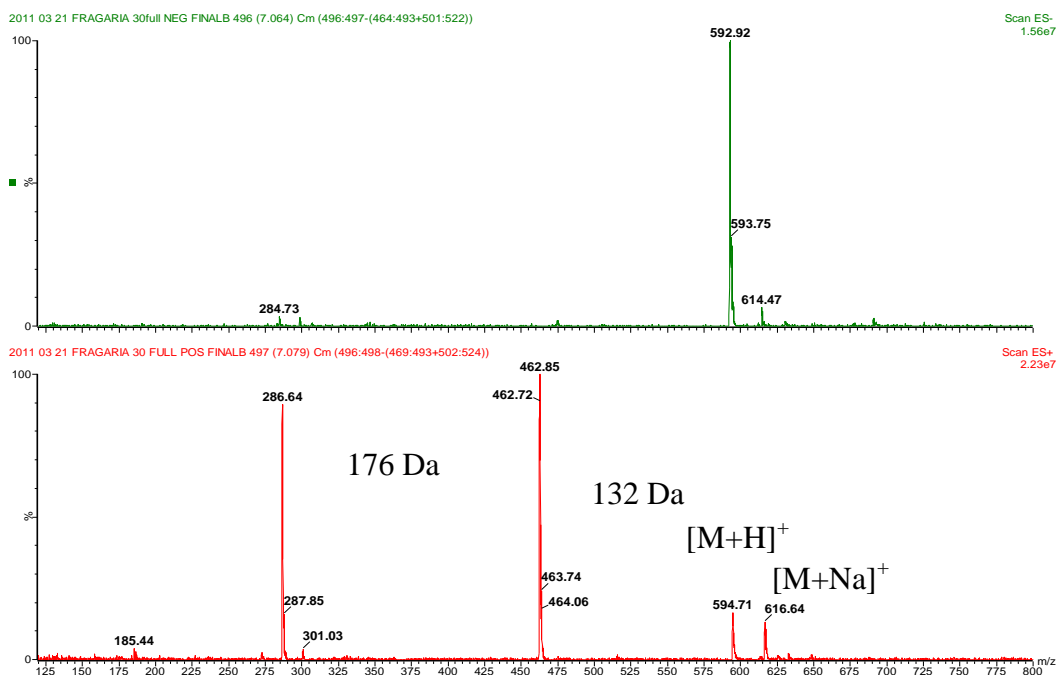
Obr. 58: Sken neutrálnych strát 162D pre $t_R = 6,9$ (ESI/ESI⁺)



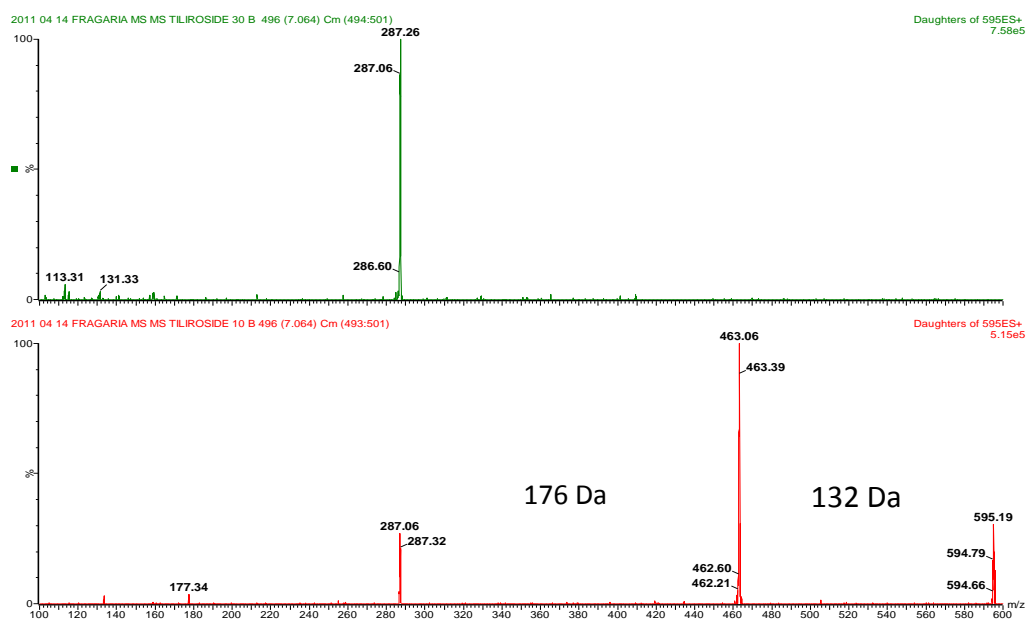
Pík 7 $t_R = 7,05$

Hlavnými molekulovými iónmi píku 7 (Obr. 59) je v ESI⁻ ión s m/z 593. V ESI⁺ je hlavný ión s m/z 595, podporovaný $[M+Na]^+ = 617$. Podľa fragmentačných spektier (Obr. 60) a spektier neutrálnych strát (viz skeny NL pre stratu 308 Da, Obr. 88 a 89), kde dochádza k strate 308, sa dá predpokladať, že sa jedná o KEM-glukurono-pentosid. Ión s m/z 463 v ESI⁺ je fragment m/z 595.

Obr. 59: MS spektrum vzorky s $t_R = 7,05$ v ESI/ESI⁺



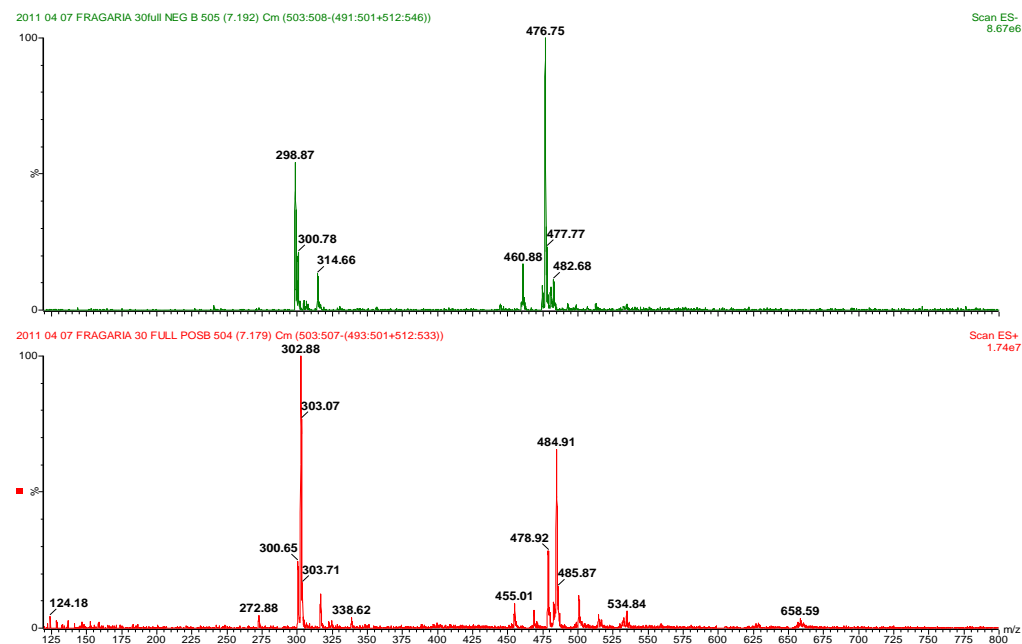
Obr. 60: Fragmentačné spektrum pre m/z 595 v ESI⁺ pri kolíznych energiách 10a 30eV



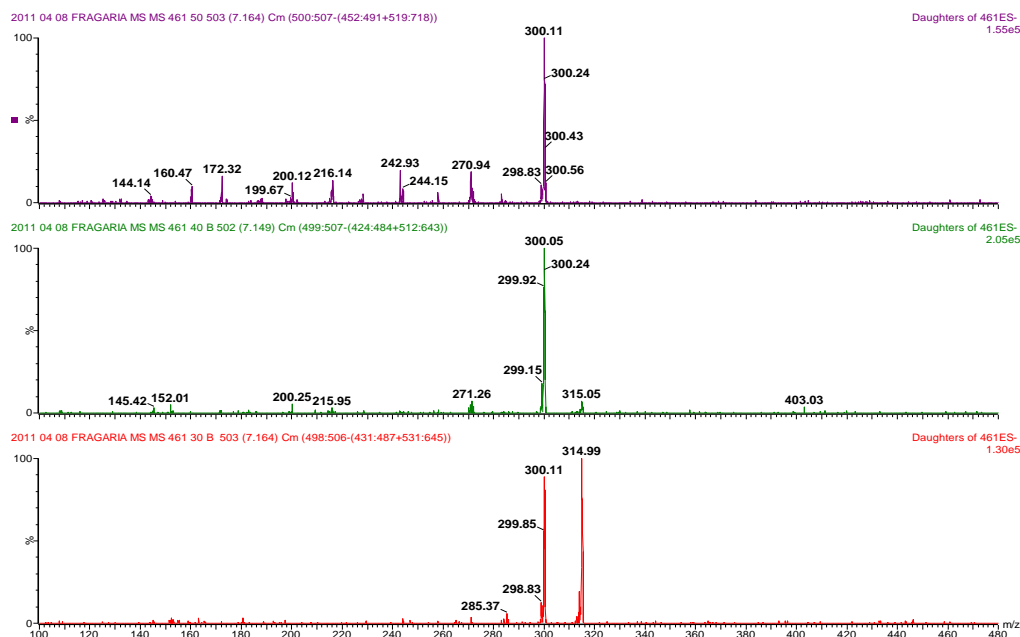
Pík 8 t_R = 7,19

Zo základného spektra píku 8 (Obr. 61) bolo určené, že obsahuje zlúčeniny s molekulovými hmotnosťami 462 a 478. Molekula s MW = 462 je pravdepodobne derivát s methylpentósou (146 Da) odvodený od zlúčeniny s molekulovou hmotnosťou 316, čo by zodpovedalo rhamnetínu alebo jeho stereoizoméru (Obr. 62). Molekula s MW = 478 obsahuje glukuronid alebo kyselinu ferulovú (176 Da) a ako aglykon quercetín.

Obr. 61: Základné spektrum pre pík 8 ESI⁻/ESI⁺



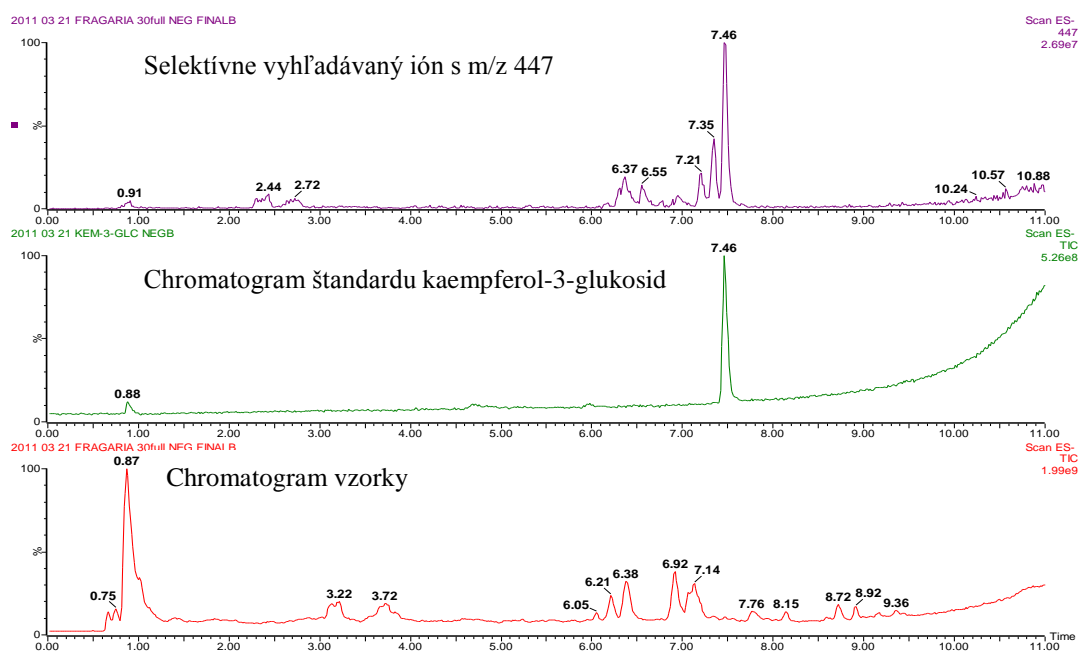
Obr. 62: MS/MS spektrá iónu s m/z 461 v ESI⁺ s použitou kolíznou energiou 30, 40 a 50 eV



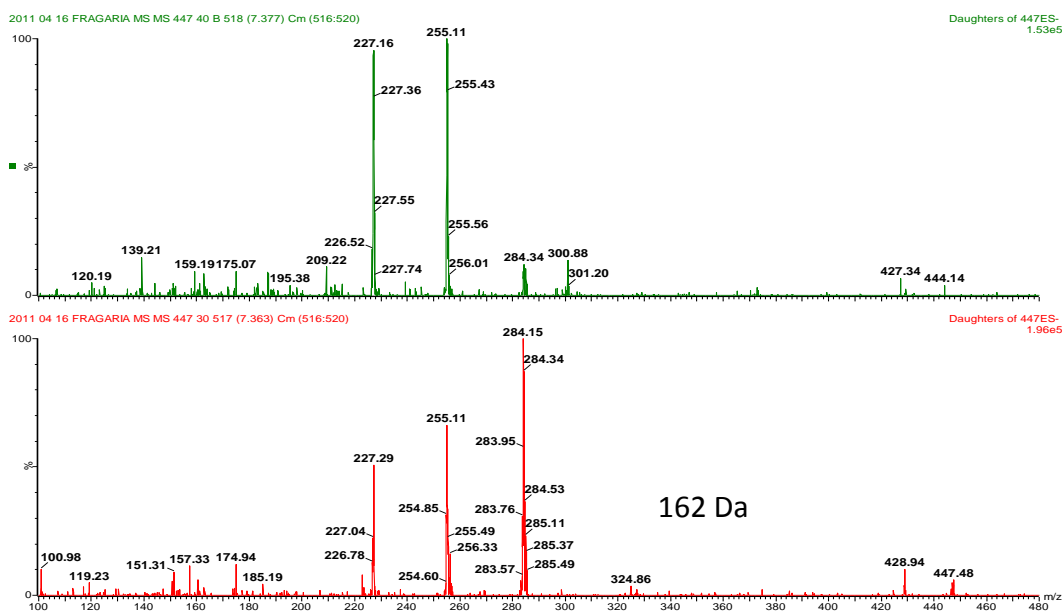
Pík 9 $t_R = 7,4$

V píku 9 bola cieľene hľadaná molekulová hmotnosť 448 pomocou RIC spektra, po tom čo bola v neutrálnych stratách určená pre tento retenčný čas stratu 162 Da a odpovedal tomu aj štandard kaempferol-3-glukosid (Obr. 63, fragmentačné skeny štandardu viz príloha 8.4). Obr. 64 znázorňuje spektrá produktových iónov v ESI⁺ pre ión s m/z 447.

Obr. 63: Overenie prítomnosti molekuly s m/z 447 v ESI⁺



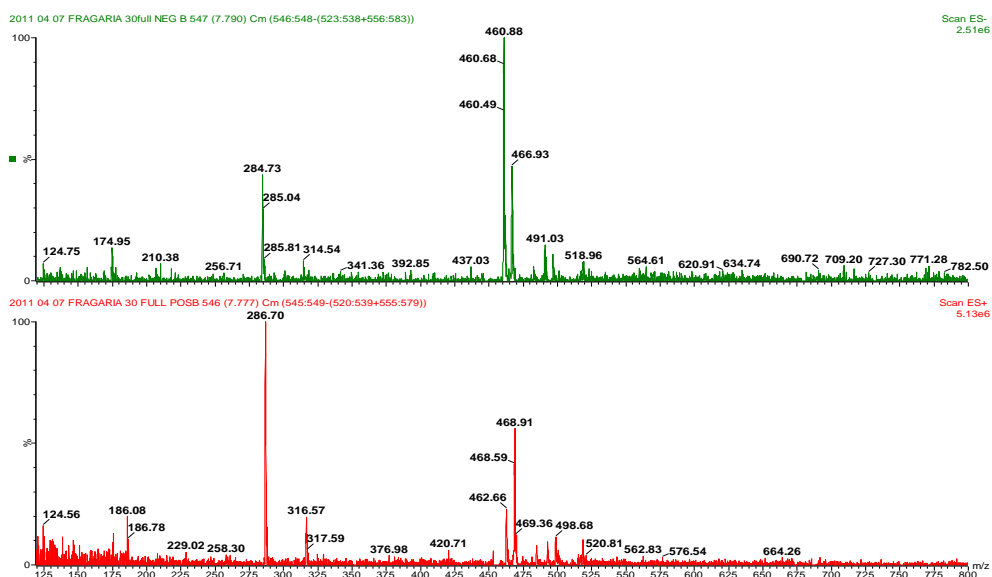
Obr. 64: Fragmentačné spektrá pre hodnotu m/z 447 v ESI⁺ pri kolíznych energiách 30 a 40 eV



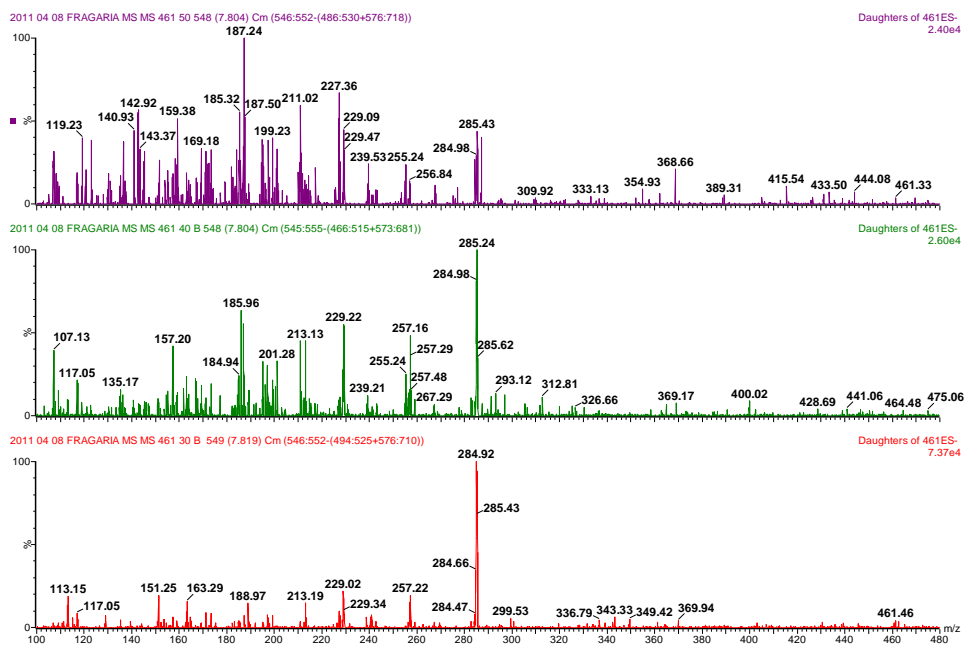
Pík 10 $t_R = 7,79$

Spektrum vzorky s retenčným časom 7,79 min obsahuje látku s molekulovou hmotnosťou 462 s dobre viditeľnými protonizovanými i deprotonizovanými iónmi a má adukt so sodíkom (Obr. 65). Podľa fragmentačného spektra (Obr. 66) bola určená ako derivát kaempferolu, rozdiel 176 Da poukazuje na glukuronid alebo kyselinu ferulovú. Ďalej tu bola odhalená zlúčenina s molekulovou hmotnosťou 316, ktorá však nebola identifikovaná, avšak podľa molekulovej hmotnosti a fragmentačného spektra (Obr. 67) sa domnievame že ide o metoxyderivát quercetínu (izomér rhamnetínu).

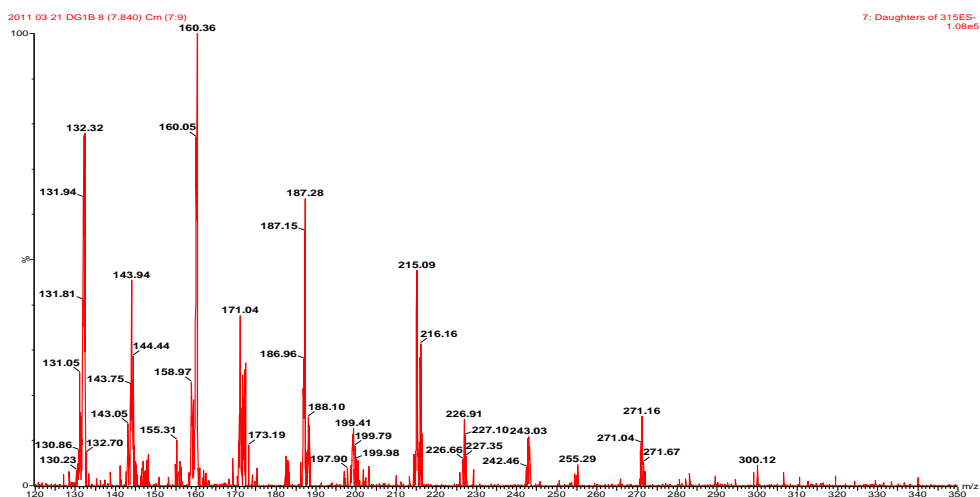
Obr. 65: Spektrum vzorky s $t_R=7,79$



Obr. 66: Fragmentačné spektrá pre m/z 461 v ESI⁺ pri kolíznej energii 30, 40 a 50 eV



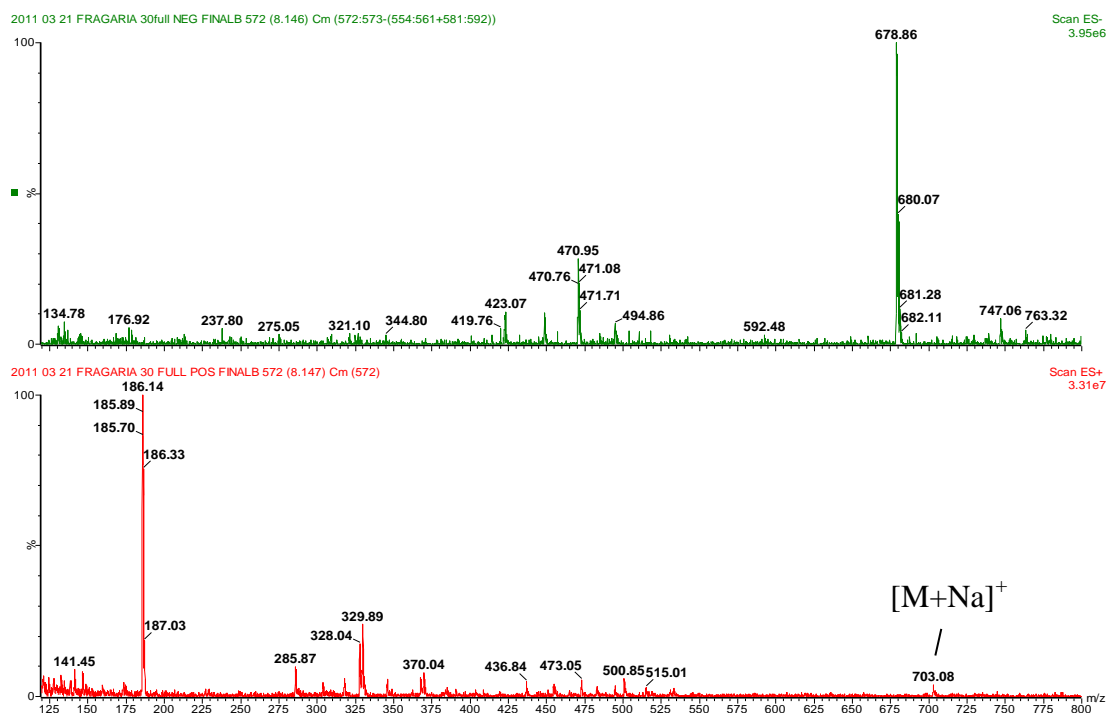
Obr. 67: Fragmentačné spektrum pre m/z 315 v ESI⁺



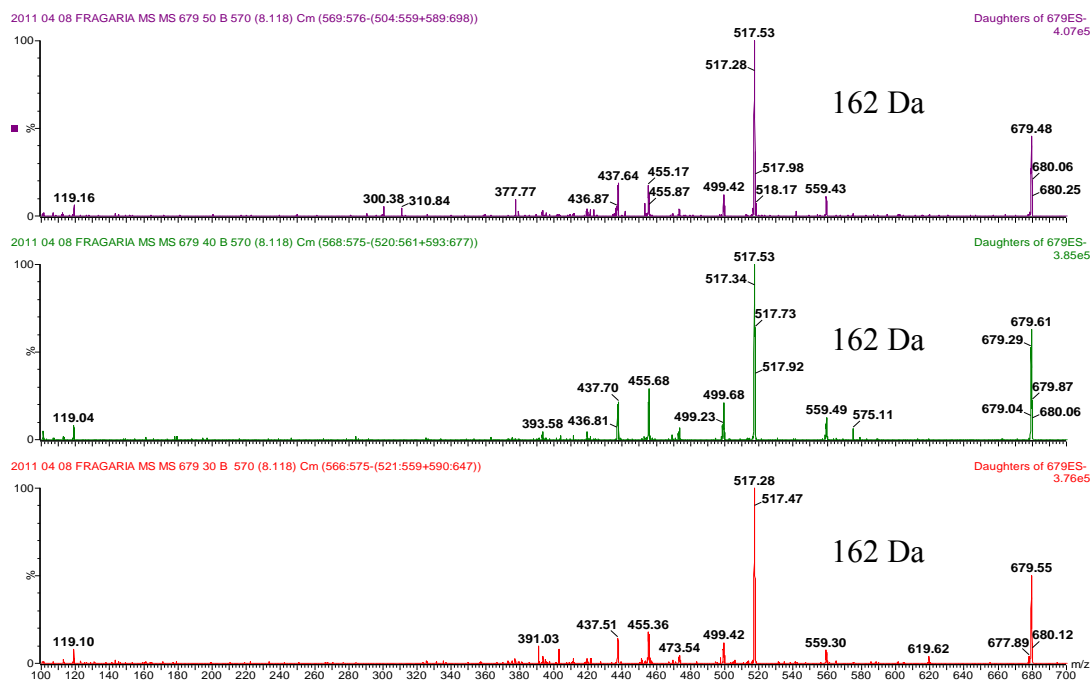
Pík 11 $t_R = 8,12$

V spektre meranom v negatívnom móde sú zjavné deprotonizované molekuly s m/z hodnotami 679 a 471 (Obr. 68). V pozitívnom režime je viditeľný len ión s m/z 703, čo je $[M+Na]^+$. Minoritne je prítomná molekula s MW = 472, ktorá je v spektre zastúpená iónmi s m/z 471 v ESI⁺ a s m/z 473 v ESI⁺. Zlúčeniny sa nepodarilo identifikovať ani podľa spektier produktových iónov (Obr. 69).

Obr. 68: Spektrum vzorky s $t_R=8,12$



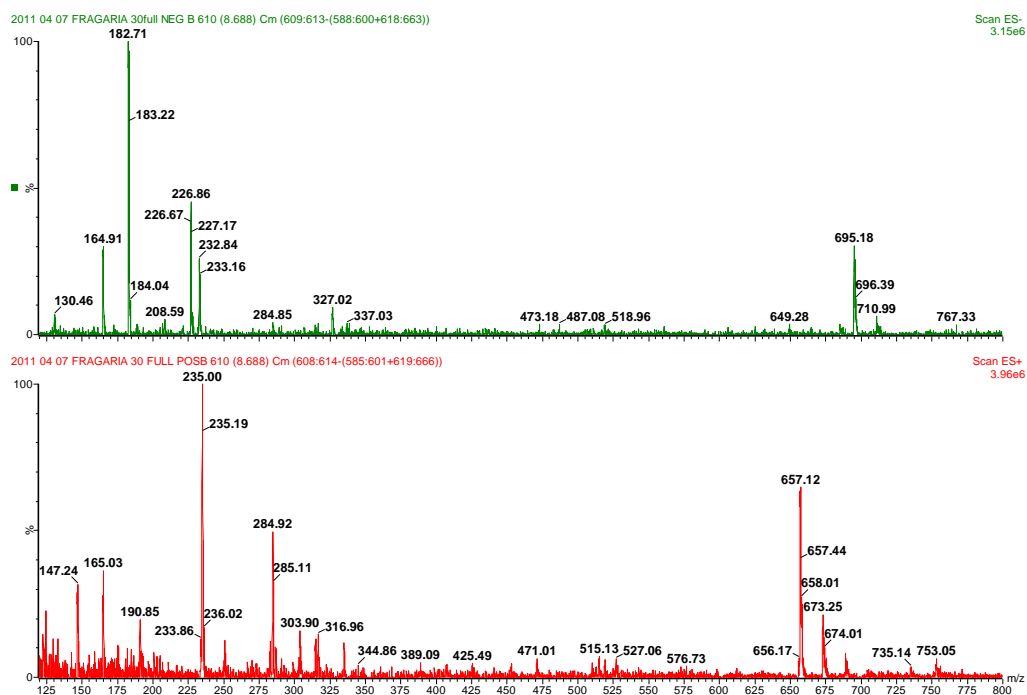
Obr. 69: Fragmentačné spektrá pre m/z 679 v ESI pri kolíznych energiách 30, 40, 50 eV



Pík 12 $t_R = 8,69$

Pík 12 (Obr. 70) sa nepodarilo identifikovať.

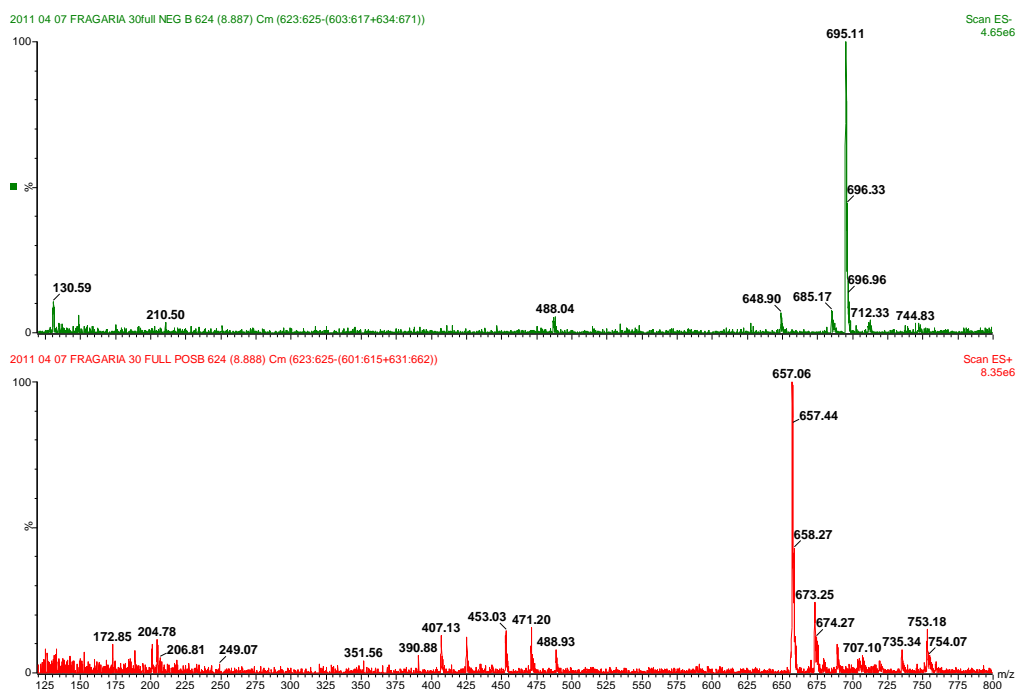
Obr. 70: MS spektrum vzorky s $t_R = 8,69$ v ESI⁻ aj ESI⁺



Pík 13 $t_R = 8,89$

V píku 13 (Obr. 71) sa pravdepodobne nachádza molekula s MW = 650, ktorá bola určená podľa vykazujúcej neutrálnej straty 162 v ESI⁻. Štruktúra zlúčeniny nebola objasnená.

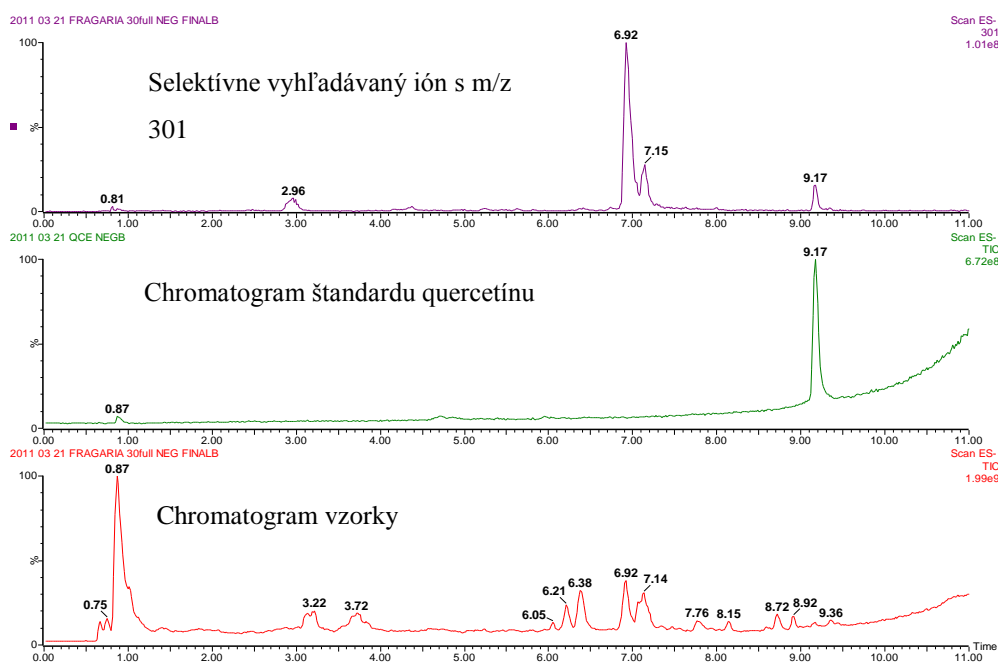
Obr. 71: MS spektrum vzorky s $t_R = 8,89$ (ESI⁻/ESI⁺)



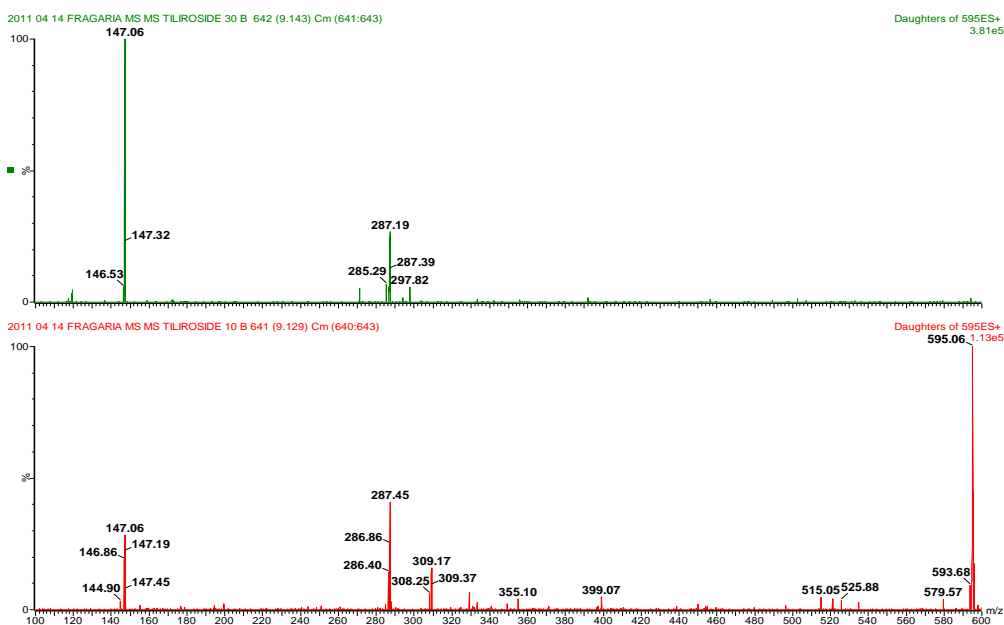
Pík 14 $t_R = 9,17$

V píku 14 sa nachádzajú zlúčeniny s molekulovou hmotnosťou 302 a 594. Zlúčenina s MW 302 podľa retenčného času a fragmentačných spektier odpovedá štandardu quercetínu (Obr. 72, Obr. 33, Obr. 34). Látka s MW 594 je pravdepodobne izomér tilirosidu (derivát kaempferolu) (Obr. 73). Pre molekulu s MW = 594 bola potvrdená neutrálna strata 308 podľa skenov neutrálnych strát.

Obr. 72: RIC spektrum vzorky a štandard quercetín v ESI⁺



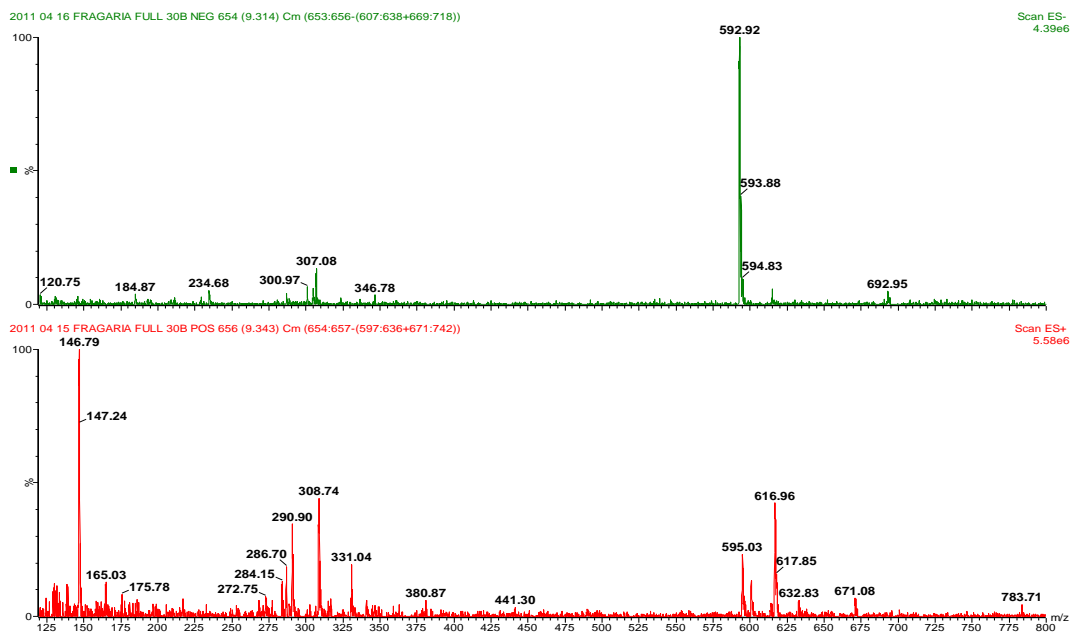
Obr. 73: Fragmentačné spektrum m/z 595 v ESI⁺ pri 10 a 30 eV



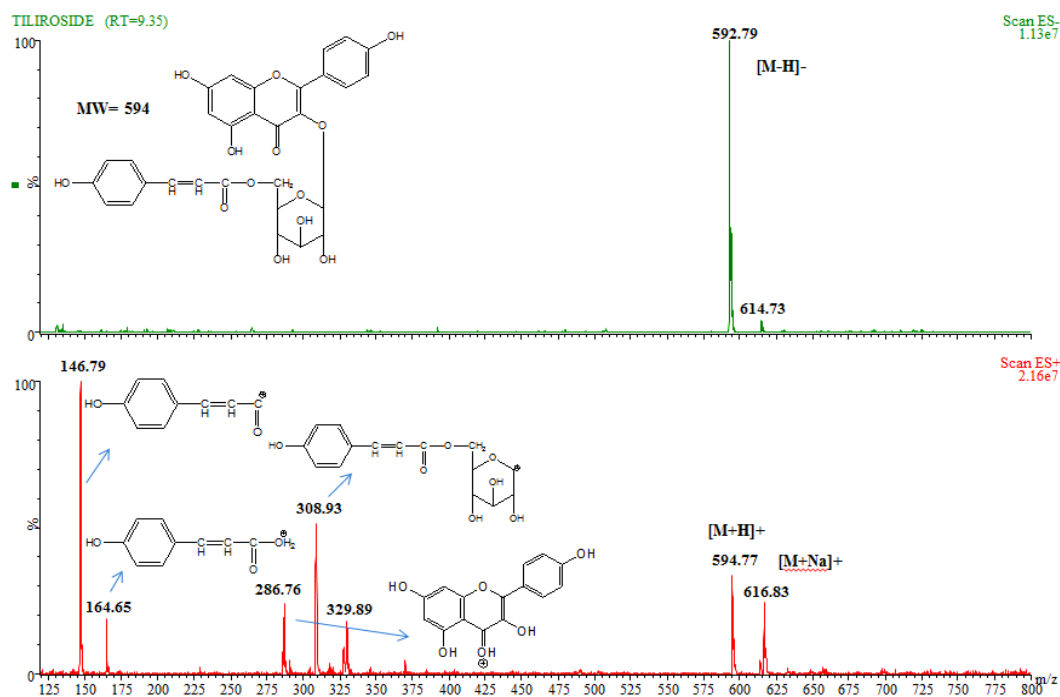
Pík 15 $t_R = 9,33$

V píku 15 bol identifikovaný tilirosid (Obr. 74), podľa MW = 594, fragmentačných spektrov (Obr. 76, Obr. 77) zhodujúcich sa s štandardom tilirosidu (Obr. 75, MS/MS spektrá viz príloha 8.4) a neutrálnej straty 308 Da (Obr. 78).

Obr. 74: Spektrum vzorky pri $t_R = 9,33$

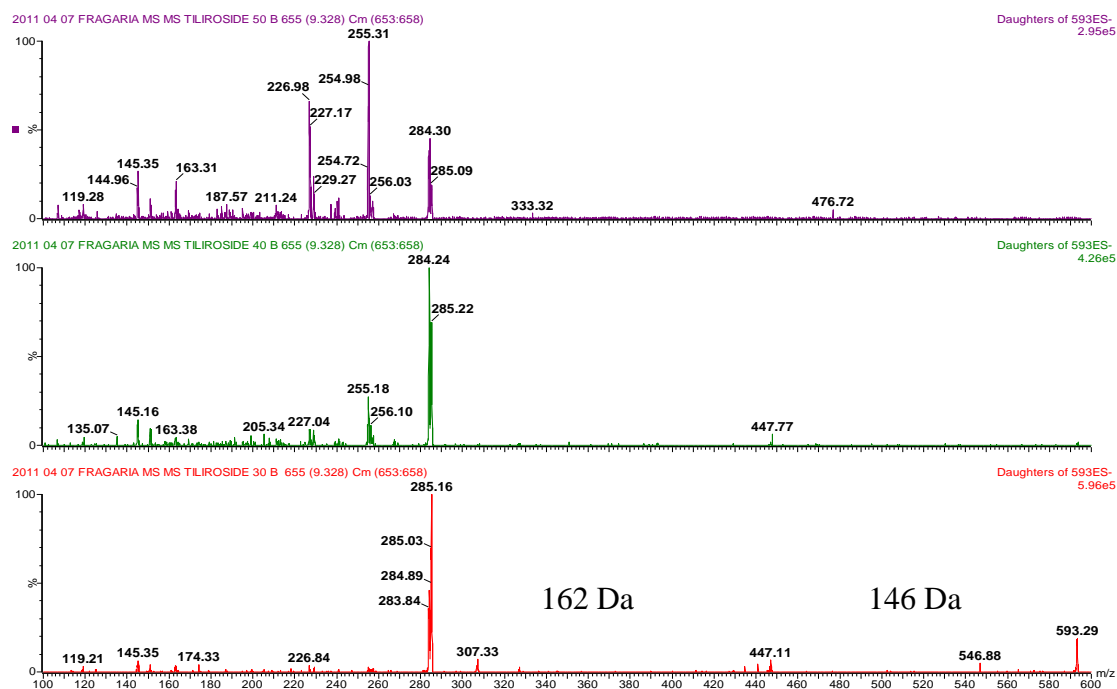


Obr. 75: Spektrum štandardu tilirosidu s $t_R = 9,35$ so vzorcom

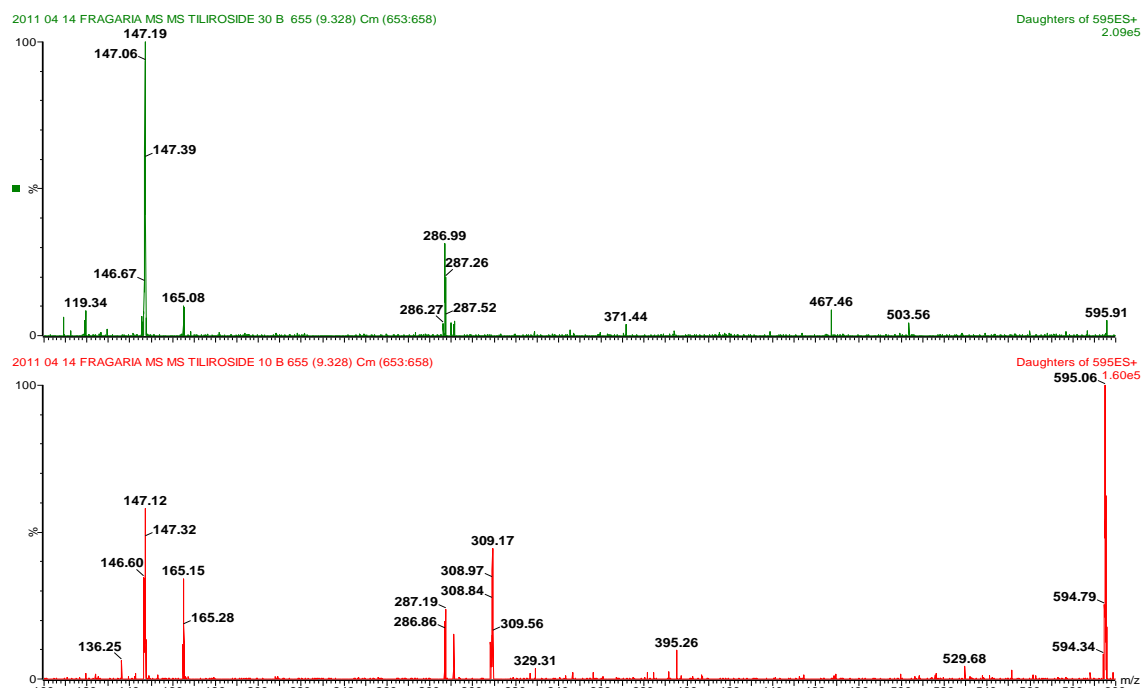


Základné spektrum vzorky obsahovalo v ESI⁻ ión s m/z 593. V ESI⁺ sa nachádzali ióny s m/z 595, adukt [M+Na]⁺ = 617 a fragmenty 309, čo by odpovedalo sacharidu s fenolickou kyselinou (glukóza s kyselinou kumarovou), a 147, čo je pravdepodobne kyselina kumarová.

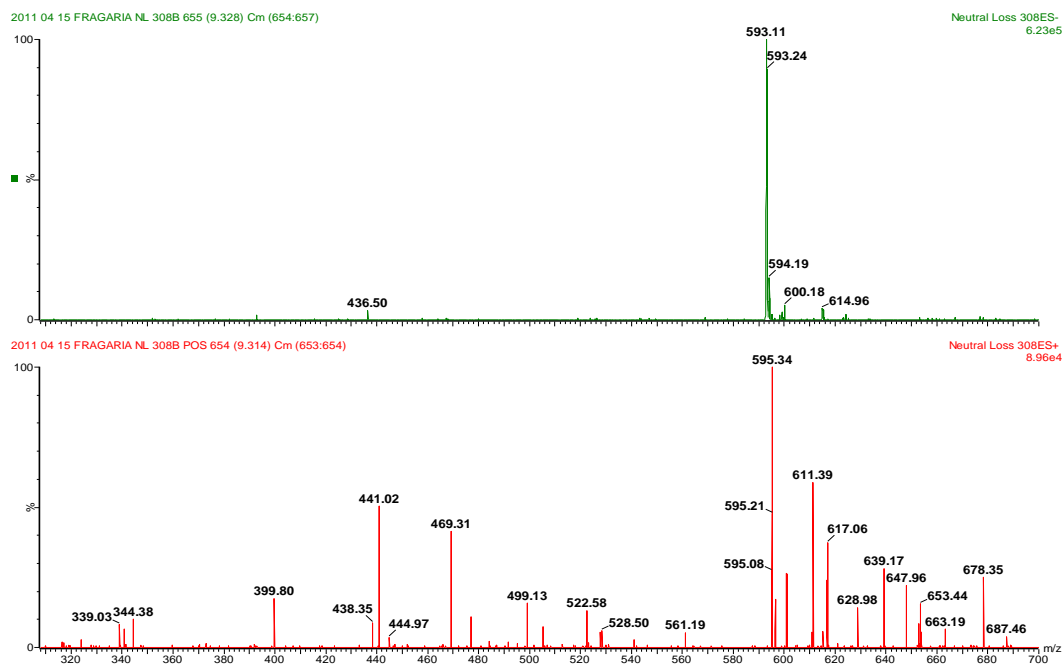
Obr. 76: Fragmentačné spektrum m/z 593 v ESI⁻ pri kolíznych energiách 30, 40 a 50 eV



Obr. 77: Fragmentačné spektrum vzorky pre m/z 595 v ESI⁺ pri kolíznych energiách 10 a 30 eV



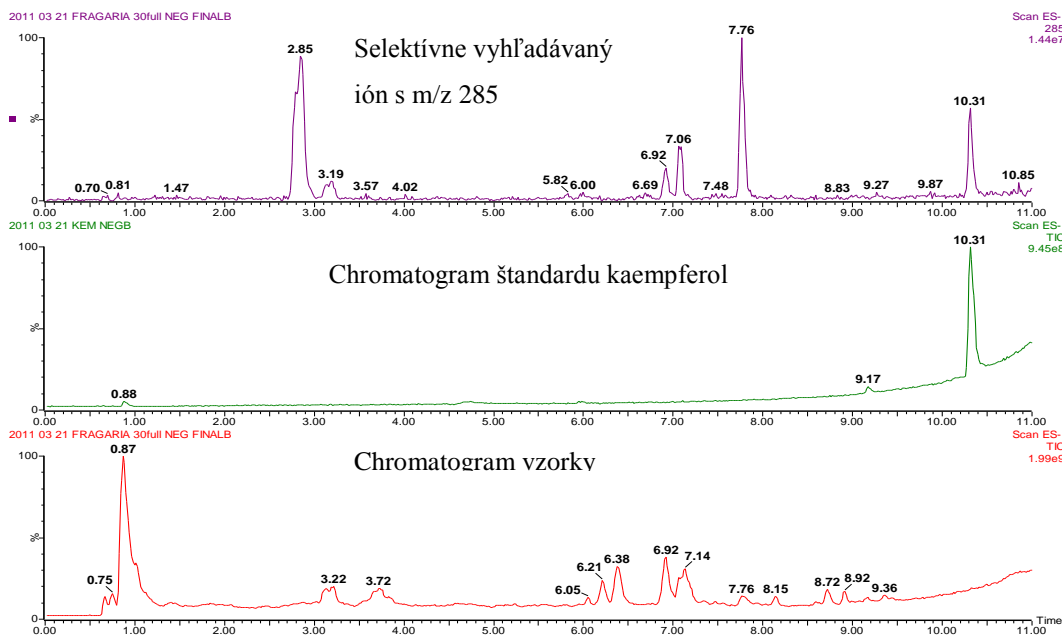
Obr. 78: NL 308 Da v ESI⁻ a ESI⁺ pre $t_R = 9,3$



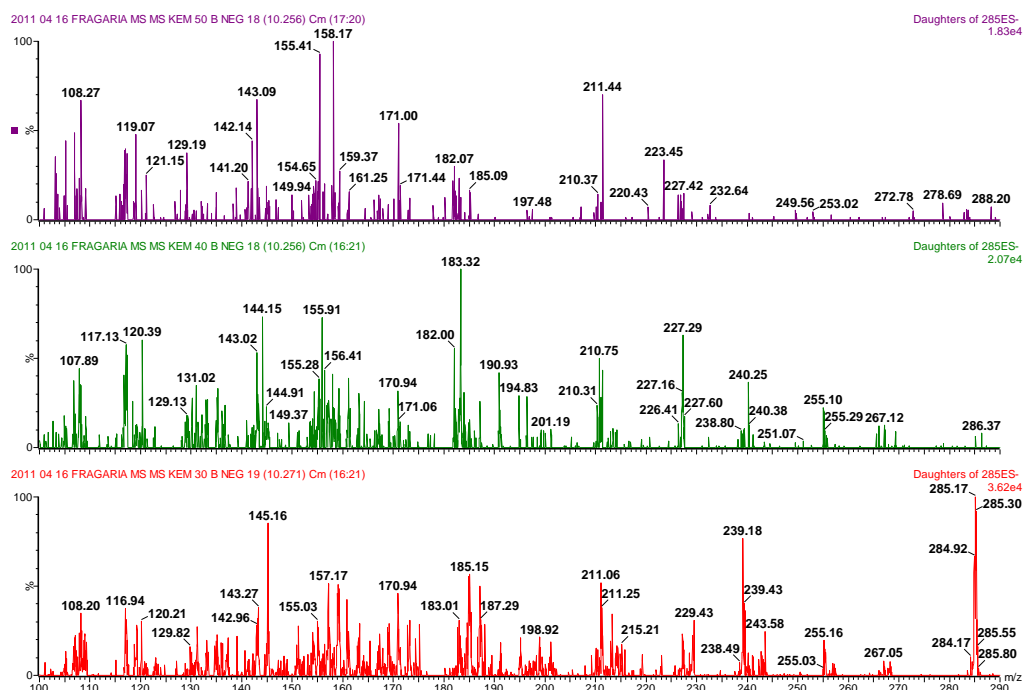
Pík 16 $t_R = 10,3$

V základnom spektre bola cielene hľadaná molekulová hmotnosť 286 (Obr. 79) a následne bola potvrdená totožnosť kaempferolu v porovnaní s hmotnostnými spektrami štandardu kaempferolu (Obr. 80, skeny produktových iónov štandardu sú uvedené na Obr. 31 a 32).

Obr. 79: RIC spektrum vzorky a štandard kaempferol v ESI⁻



Obr. 80: Fragmentačné spektrá vzorky pre m/z 285 v ESI pri kolíznych energiách 30, 40 a 50 eV



5.5 Skeny neutrálnych strát

V neposlednej rade boli premerané skeny neutrálnych strát pre skúšanú vzorku a zmes štandardov (peltatosid, tilirosid, rutín, isoquercitrín, diosmin, hesperidín, kaempferol-3-O-glukosid), ktoré obsahovali vybrané glykosidy obsahujúce rôzne kombinácie cukrov. Niektoré cukry a fenolické kyseliny sa zhodujú neutrálnou stratou. Možnosti neutrálnych strát zhŕňa Tabuľka 11. Flavonoidy a ich príbuzné látky obsahujú v štruktúre ako substituenty prevažne sacharidy. Ako neutrálne straty boli zvolené straty 308 (zložená zo 146 + 162 alebo 176 + 132), 294 (zložená zo 162 + 132), 162, 146 a 132 Da pre identifikáciu O-glykosidov. Následne sa určili straty jednotlivých molekúl a porovnali spektrá vzorky a štandardov. Neutrálne straty štandardov slúžia na porovnanie a jednoduchšiu interpretáciu spektier a na nastavenie MS/MS metódy pre meranie NL vzorky.

Tabuľka 11: Možné neutrálne straty

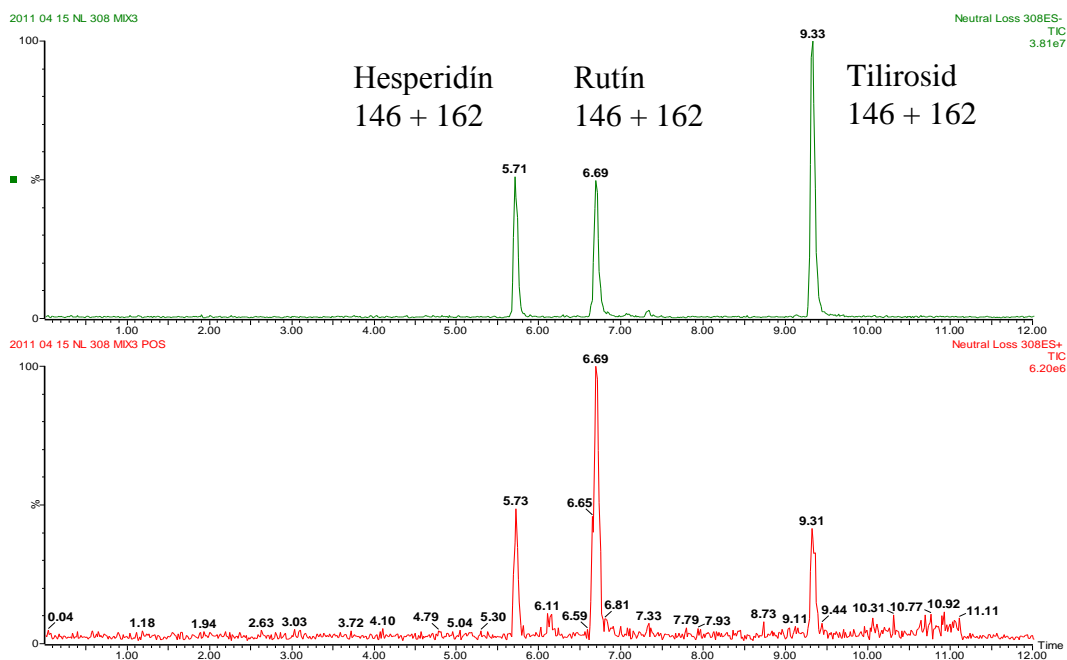
CUKRY	SUMÁRNÍ VZOREC	MW	NL
monosacharidy			
HEXOSA (glukósa, galaktósa)	$C_6H_{12}O_6$	180.0634	162.0528
METHYLPENTOSA (DEOXYHEXOSA) (rhamnosa, fucosa)	$C_6H_{12}O_5$	164.0685	146.0579
PENTOSA (ribosa, arabinosa, xylosa, lyxosa)	$C_5H_{12}O_5$	150.0528	132.0423
disacharidy			
HEXOSYLHEXOSA (glc-glc: genciobiosa, soforosa)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	342.1162	324.1056
METHYLPENTOSYLHEXOSA (rhamnosylglucosa – rutinosa, neohesperidosa rhamnosylgalactosa – robinosa)	$C_{12}H_{22}O_{10}$	326.1213	308.1107
PENTOSYLHEXOSA (xyloglucosa, xylogalactosa)	$C_{11}H_{20}O_{10}$	312.1056	294.0951
trisacharidy			
HEXOSYLHEXOSYLHEXOSA	$C_{18}H_{32}O_{16}$	504.169	486.1585
XYLOSYLROUTINOSA	$C_{17}H_{30}O_{14}$	458.1636	440.1530
FENOLICKÉ KYSELINY			
octová	$C_2H_4O_2$	60,0211	42.0105
malonová	$C_3H_4O_4$	104,0110	86.0004
jantarová	$C_4H_6O_4$	118,0266	100.0160
jablečná	$C_4H_6O_5$	134,0215	116.0109
benzoová	$C_7H_6O_2$	122.0368	104.0262
syringová	$C_9H_{10}O_5$	198.0528	180.0422
p-kumarová	$C_9H_8O_3$	164.0473	146.0367
kávová	$C_9H_8O_4$	180.0423	162.0317
ferulová	$C_{10}H_{10}O_4$	194.0579	176.0473
sinapová	$C_{11}H_{12}O_5$	224.0685	206.0579
pyruvát	$C_3H_4O_3$	88.0160	70

5.5.1 NL referenčných štandardov

NL 308

NL 308 Da zobrazuje Obr. 81. Podľa štruktúry štandardov sa dá predpokladať NL 308 u štandardov hesperidínu, rutínu a tilirosidu, čo potvrdili tieto spektrá. Hesperidín obsahuje v štruktúre disacharid neohesperidózu, ktorá vykazuje NL 308. Rutín obsahuje v štruktúre disacharid rutinózu s NL 308 a tilirosid obsahuje v štruktúre kumaroyl-glukosid. Tieto jednotlivé sacharidy bez využitia HRMS vykazujú zhodnú hmotnosť.

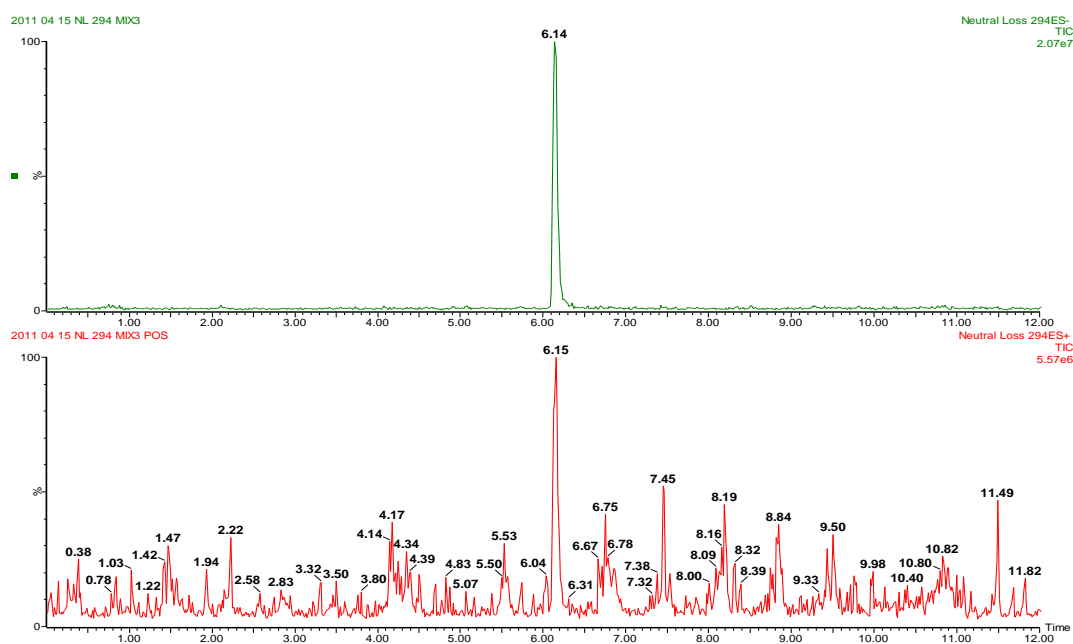
Obr. 81: NL 308 Da zmesi štandardov (ESI/ESI⁵)



NL 294

NL 294 Da (Obr. 82) zo zmesi štandardov vykazuje štandard peltatosid, ktorý v štruktúre obsahuje disacharid pentosyl-hexosid.

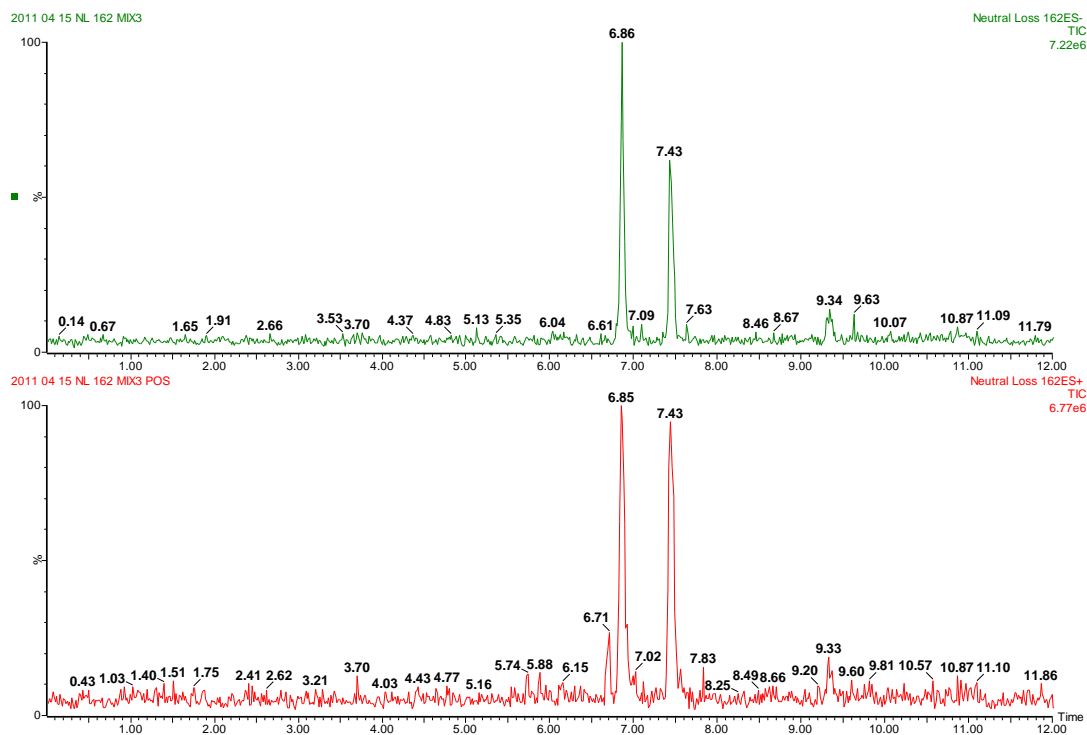
Obr. 82: NL 294 zmesi štandardov (ESI/ESI⁺)



NL 162

NL 162 Da vyobrazuje Obr. 83. Túto NL poskytujú dva štandardy a to isoquercitrín a kaempferol-3-O-glukosid. V oboch prípadoch sa jedná o glukózu.

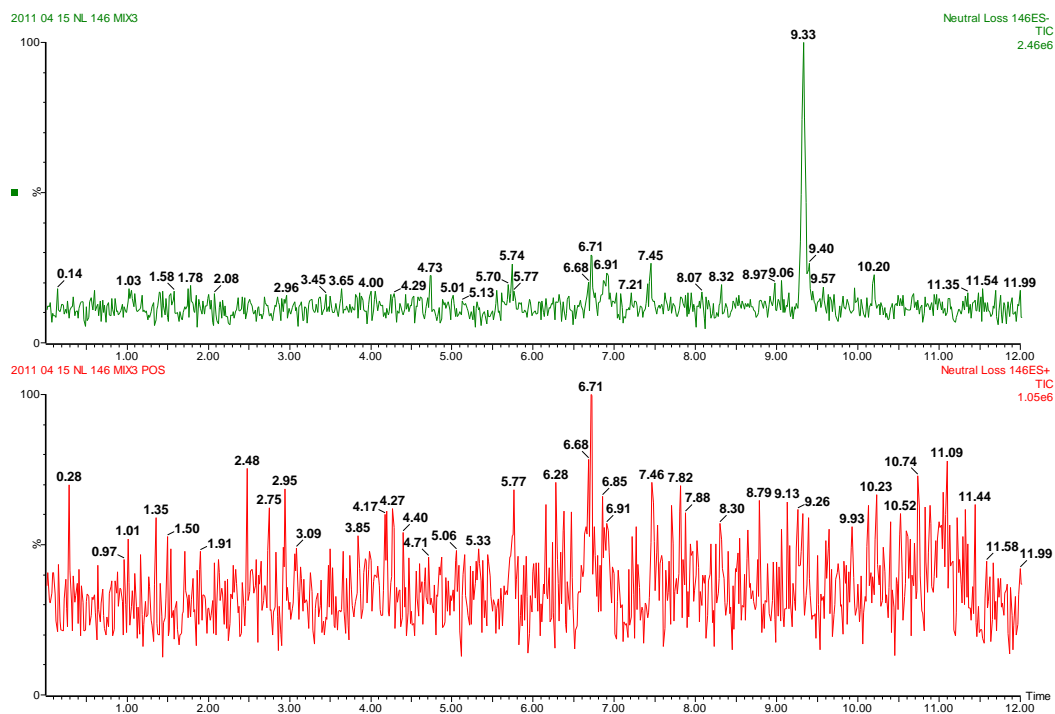
Obr. 83: NL 162 Da zmesi štandardov (ESI/ESI⁺)



NL 146

NL 146 Da bola pozorovaná len v ESI⁻ (Obr. 84). Jednalo sa o kumarovú kyselinu odštiepenú zo štandardu tilirosidu.

Obr. 84: NL 146 Da zmesi štandardov



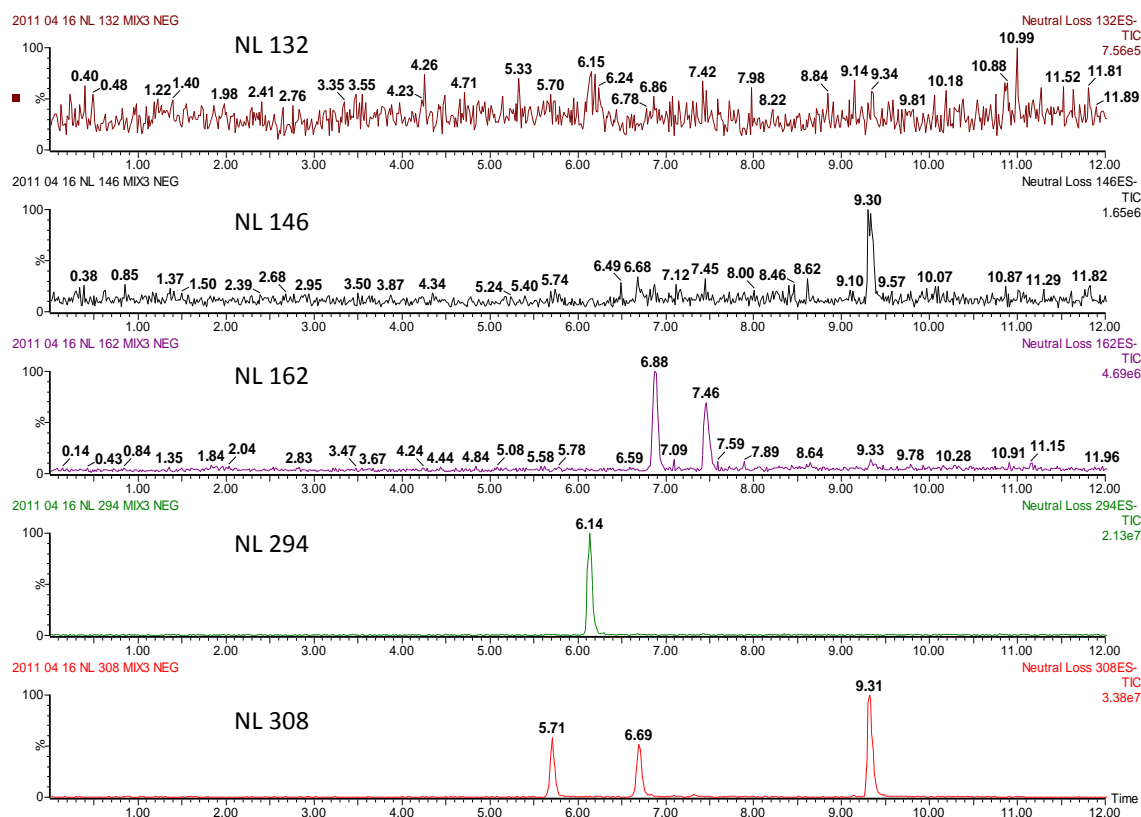
NL 132

NL 132 Da neposkytuje ani jeden so štandardov v zmesi.

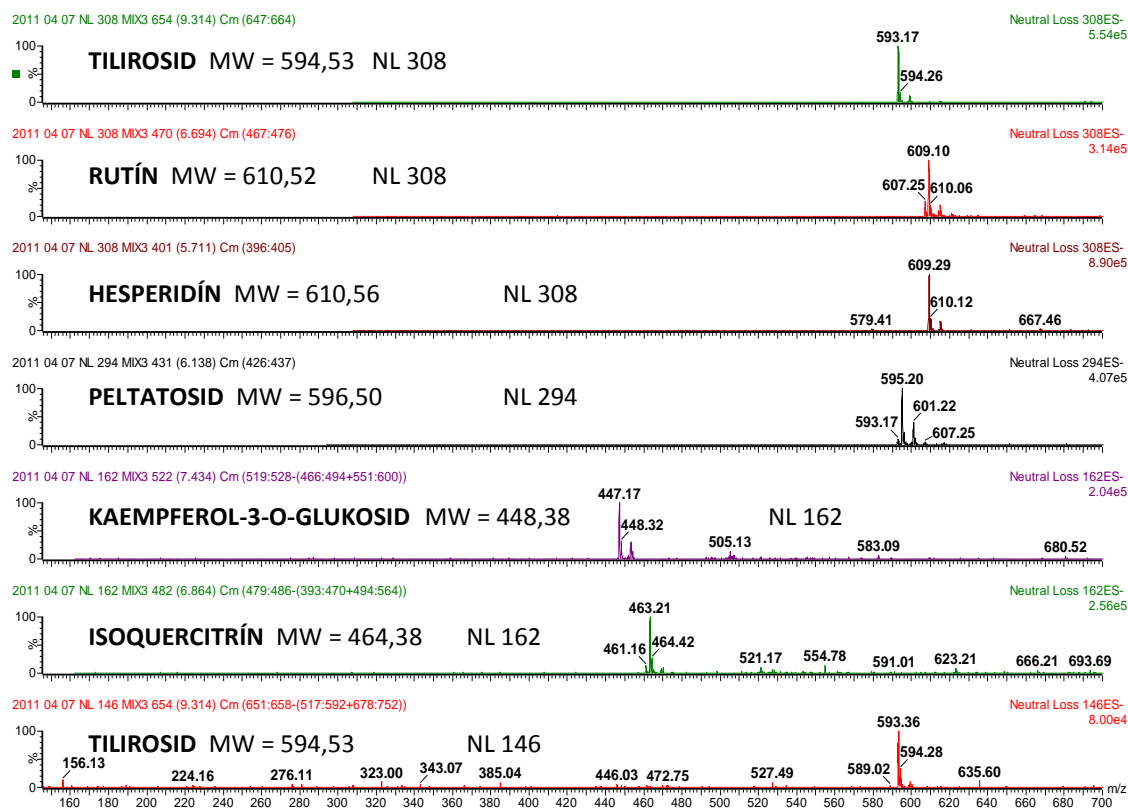
Súhrn NL štandardov

Nasledujúce obrázky poskytujú prehľadný pohľad na neutrálne straty z použitej zmesi štandardov. Obr. 85 zobrazuje NL štandardov zoradené podľa vykazovaných neutrálnych strát, s ktorých je možné získať jednotlivé spektrá. Konkrétne spektrá NL štandardov: tilirosidu, rutínu, hesperidínu, peltatosidu, kaempferol-3-O-glukosidu a isoquercitrínu zobrazuje Obr. 86. Tilirosid vykazoval dve rôzne NL 146 (k.kumarová) a 308 (kumaroyl-glukosid) (Obr. 87).

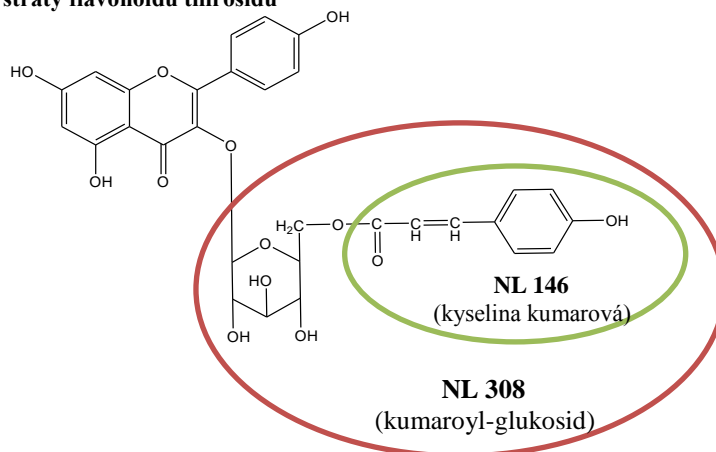
Obr. 85: Súhrný zoznam neutrálnych strát štandardov v ESI



Obr. 86: Skeny NL zmesi štandardov zoradené podľa straty v ESI



Obr. 87: Neutrálne straty flavonoidu tilirosidu

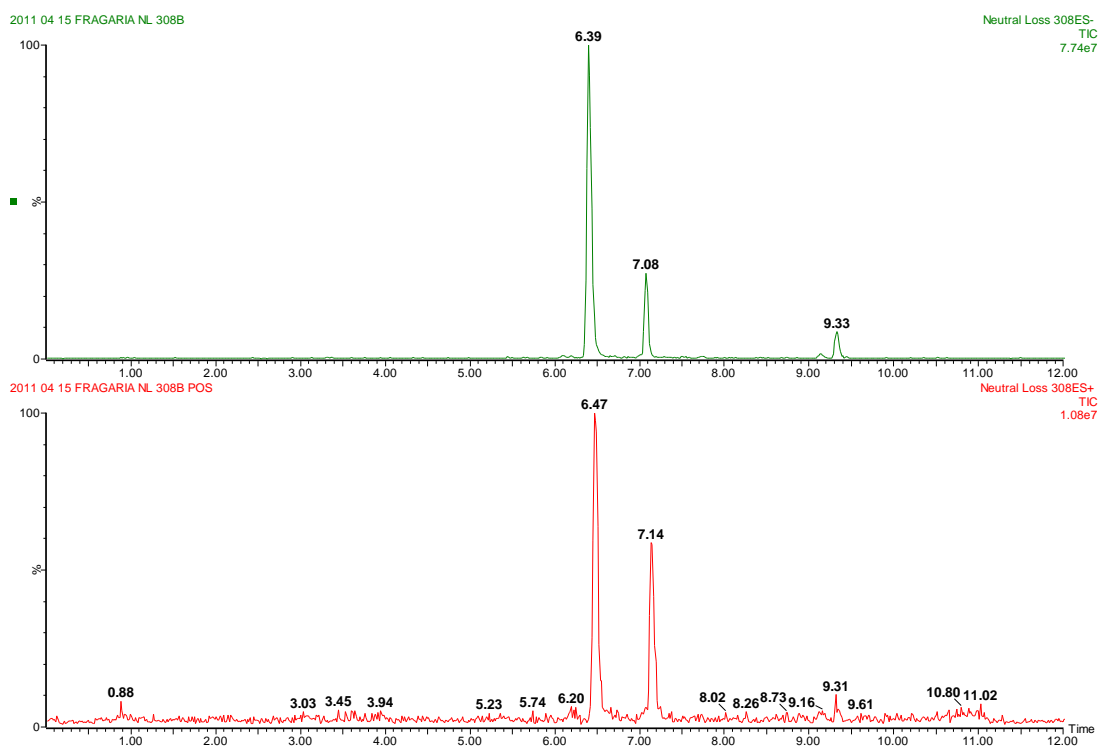


5.5.2 NL vzorky

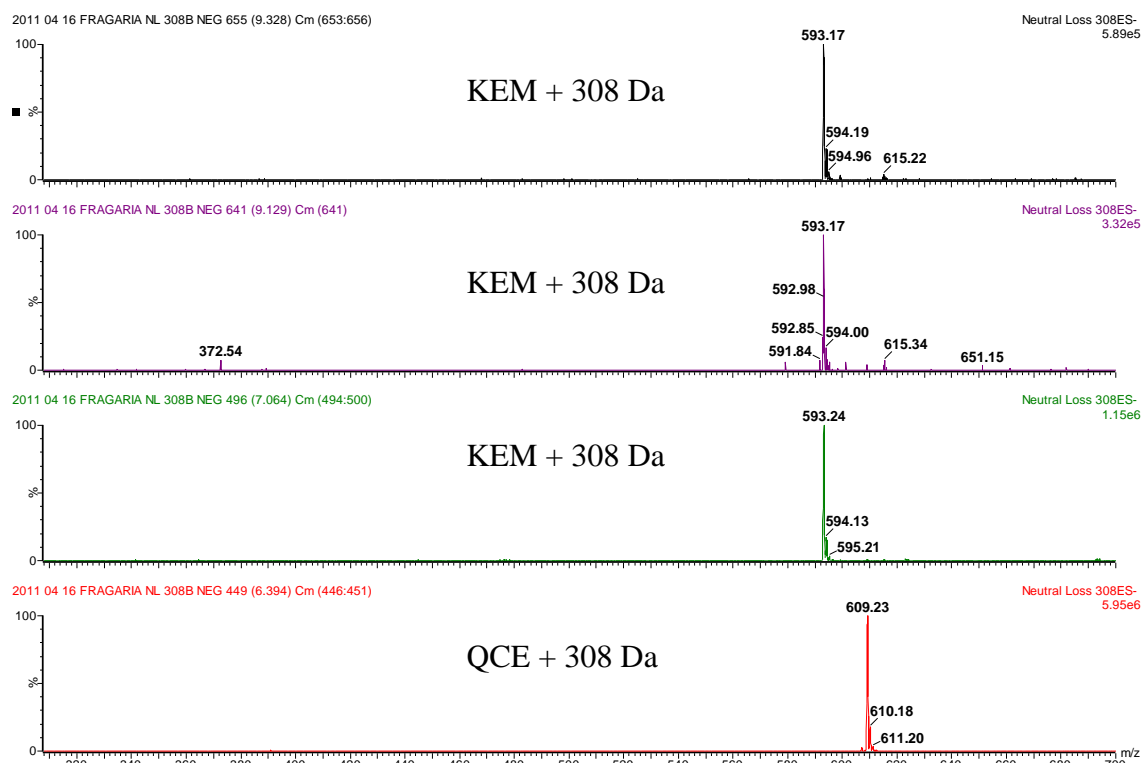
NL 308 vzorky

Obr. 88 súhrne zobrazuje, kde sa vyskytujú neutrálne straty 308 Da vo vzorke. Konkrétne m/z hodnoty iónov, ktoré poskytujú tieto straty vyobrazujú Obr. 89 a Obr. 90. Na týchto skenoch sú tiež znázornené predpokladané aglykony s neutrálnou stratou vypočítané s molekulovej hmotnosti vyobrazeného iónu. Na porovnanie slúžia neutrálne straty štandardov.

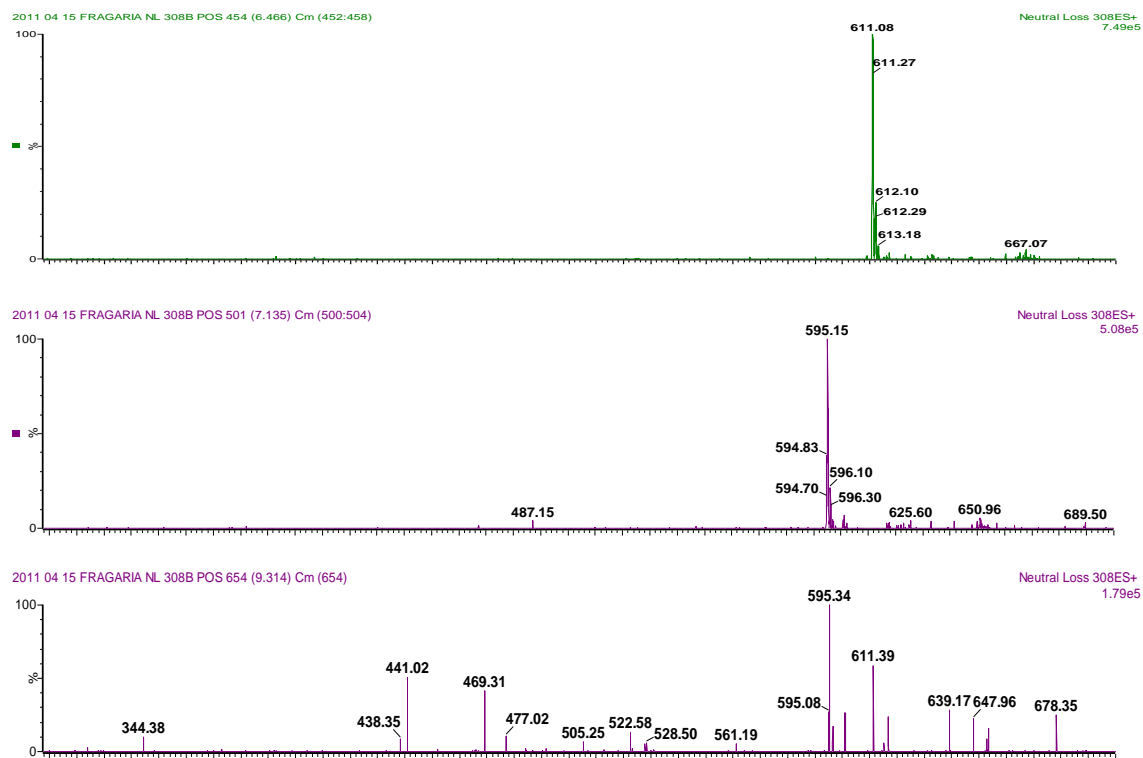
Obr. 88: Sken vzorky neutrálnej straty 308 Da v pozitívnom aj negatívnom režime



Obr. 89: NL 308 Da vo vzorke v ESI⁻



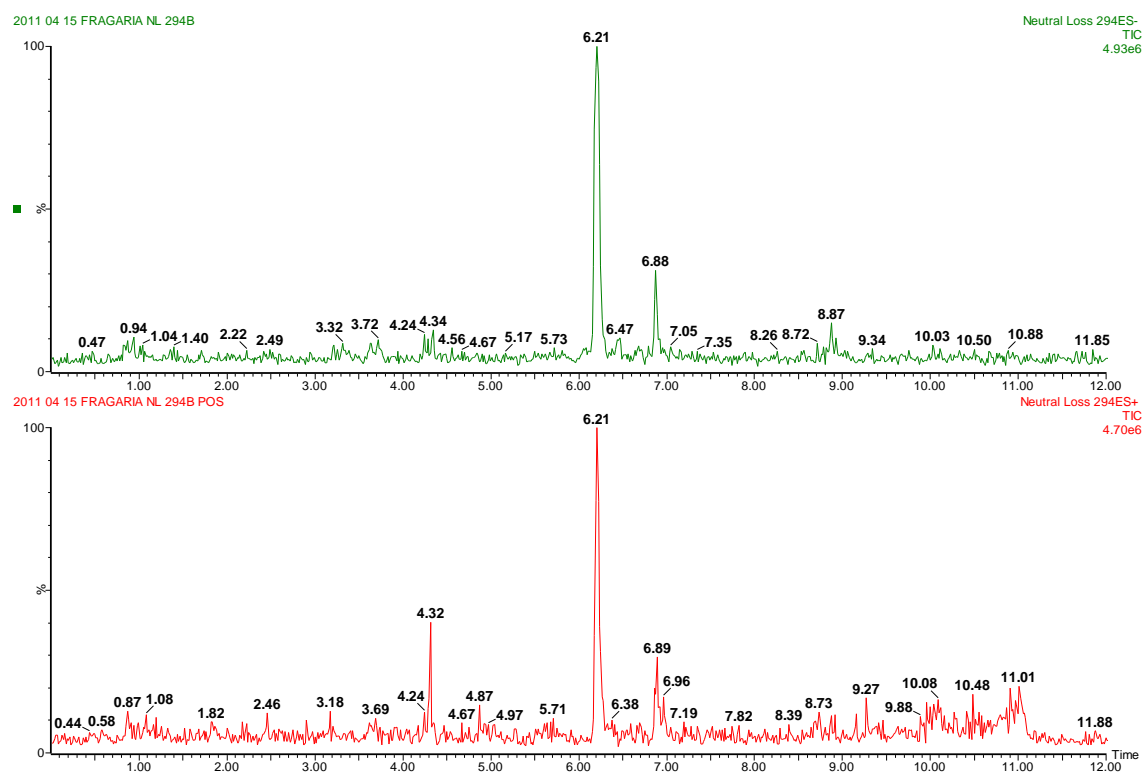
Obr. 90: NL 308 Da vo vzorke v ESI⁺



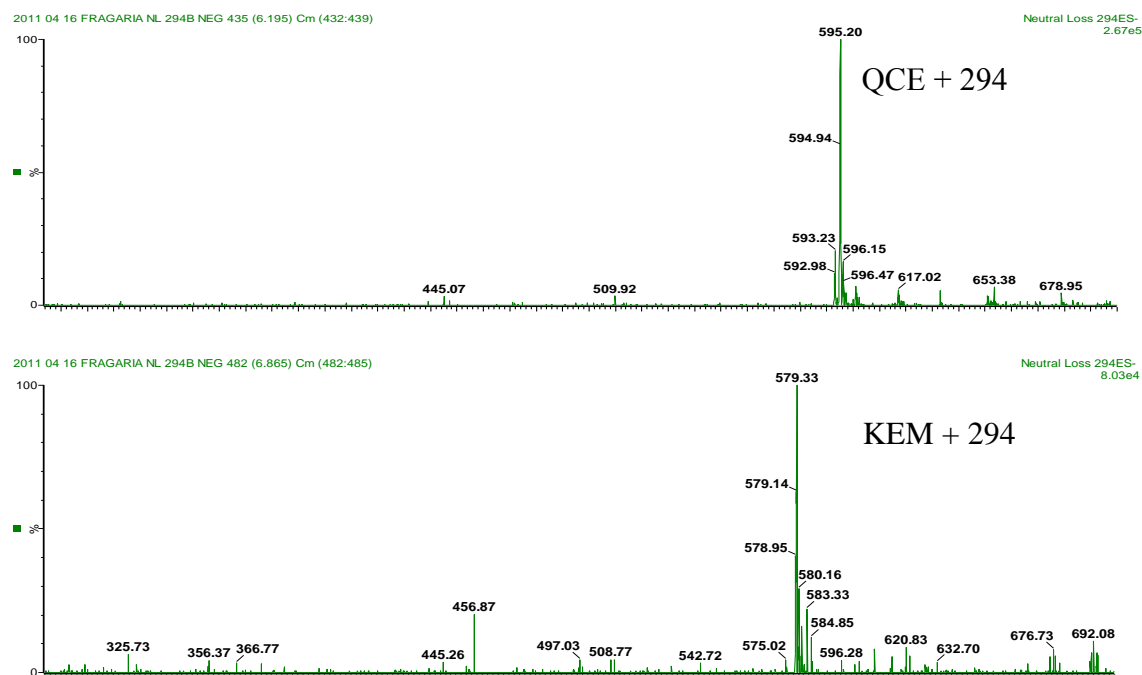
NL 294 vzorky

Nasledujú neutrálne straty 294 Da vo vzorke (Obr. 91., Obr. 92., Obr. 93.).
294 Da odpovedá pravdepodobne disacharidu (pentóza + hexóza).

Obr. 91: NL 294 Da vo vzorke v ESI^+ aj ESI^-



Obr. 92: Skeny neutrálnych strát 294 Da v ESI^-



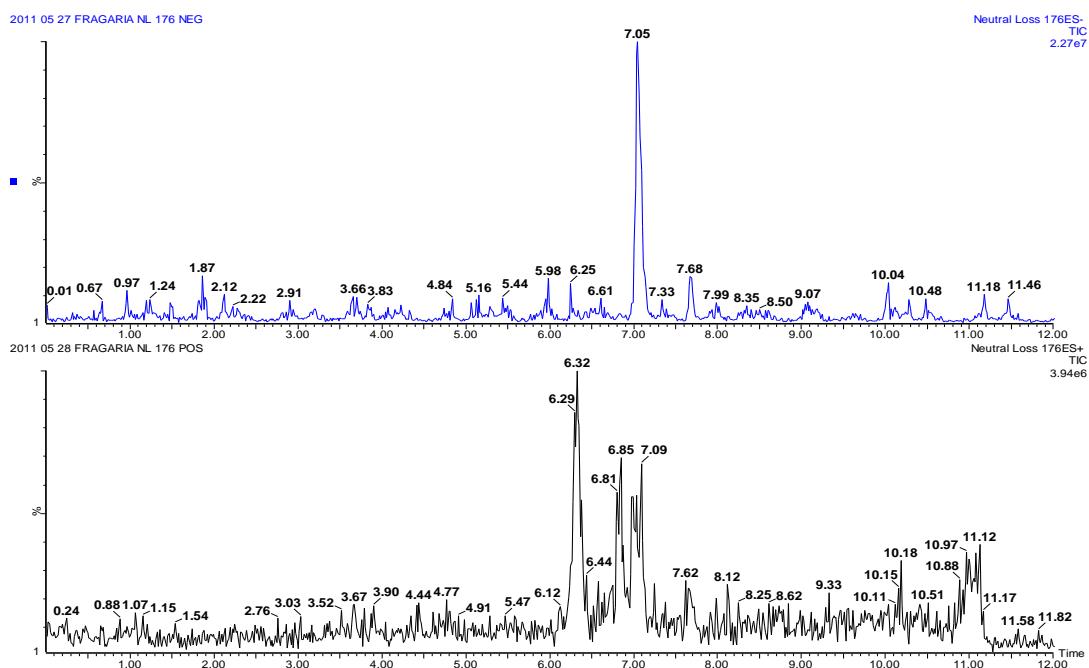
Obr. 93: Sken NL 294 Da v ESI⁺



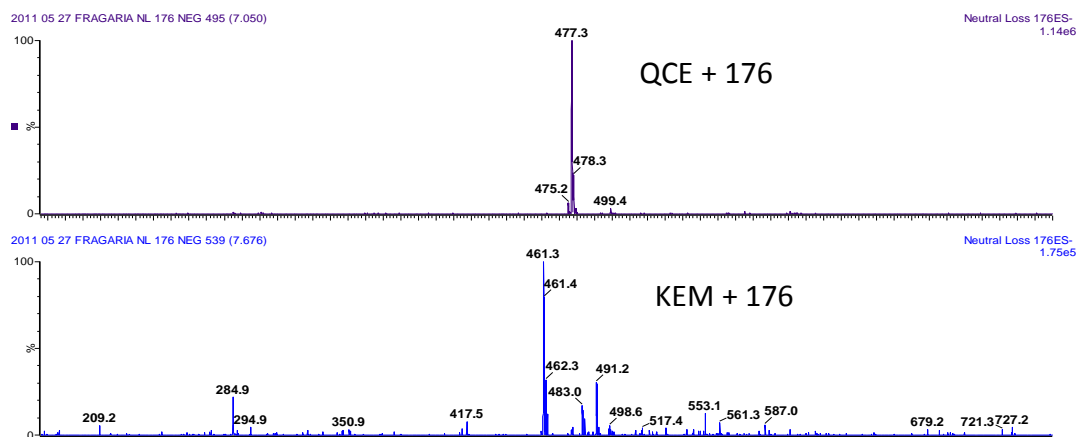
NL 176 vzorky

Neutrálne straty 176 Da predstavujú glukuronid alebo kyselinu ferulovú. Spektrá zobrazujú Obr. 94 – 96.

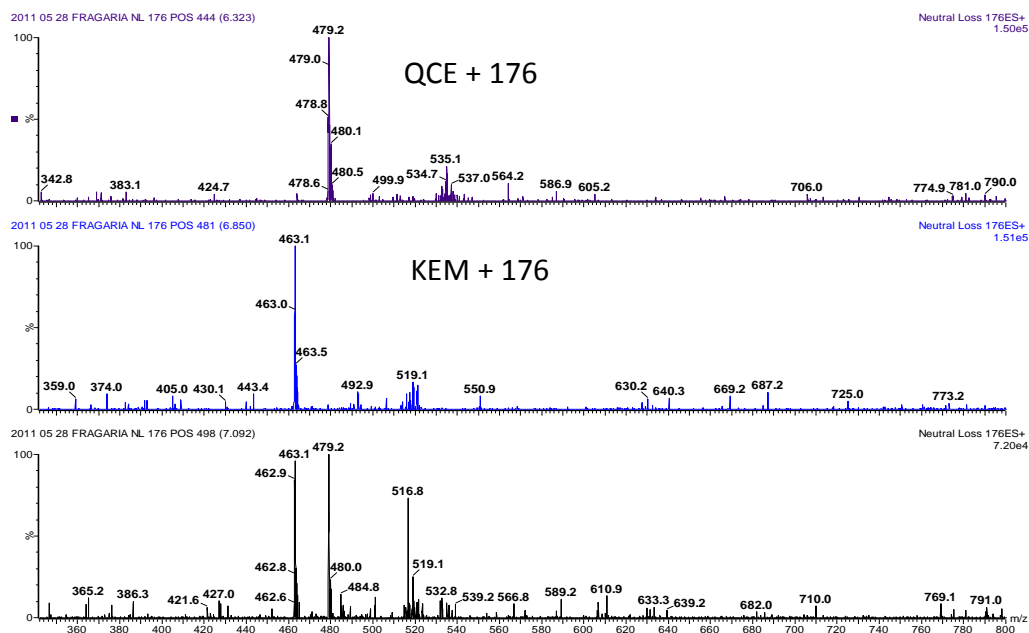
Obr. 94: NL 176 Da vo vzorke v ESI⁻ aj ESI⁺



Obr. 95: Skeny NL 176 Da v ESI⁻



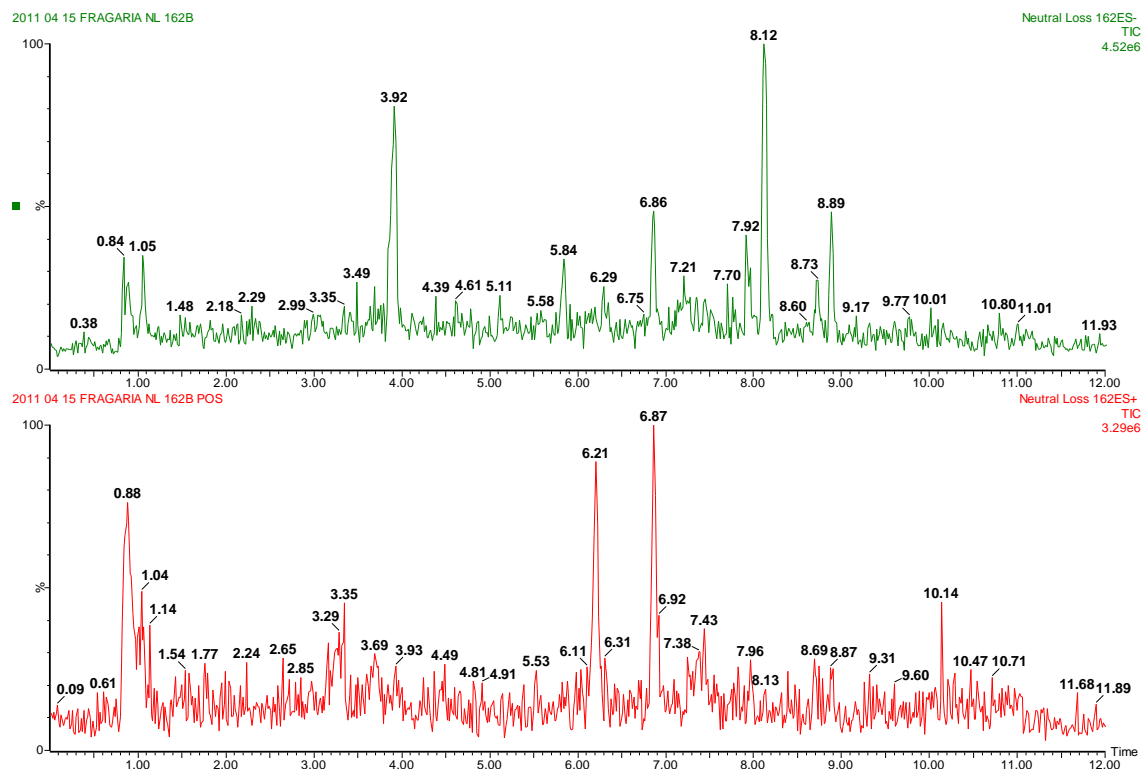
Obr. 96: Skeny NL 176 Da v ESI⁺



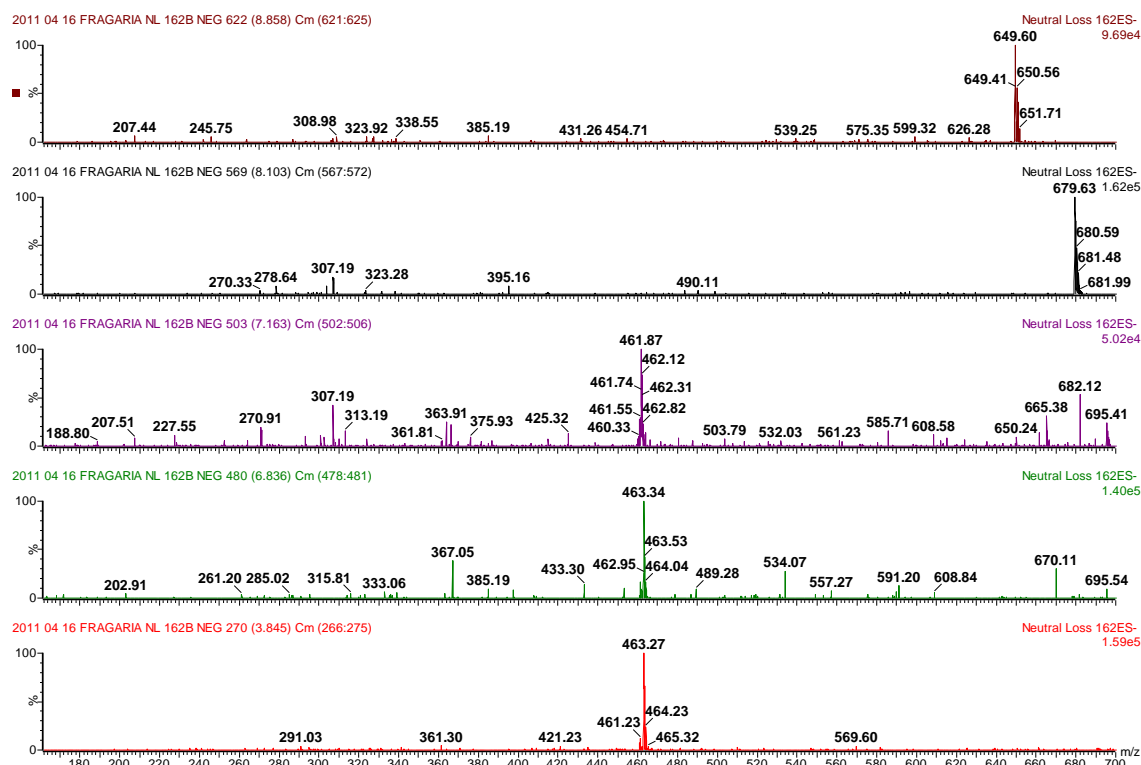
NL 162 vzorky

Neutrálne straty 162 Da sú vyobrazené na Obr. 97, Obr. 98, Obr. 99. Neutrálna strata 162 Da predstavuje najpravdepodobnejšie hexózu.

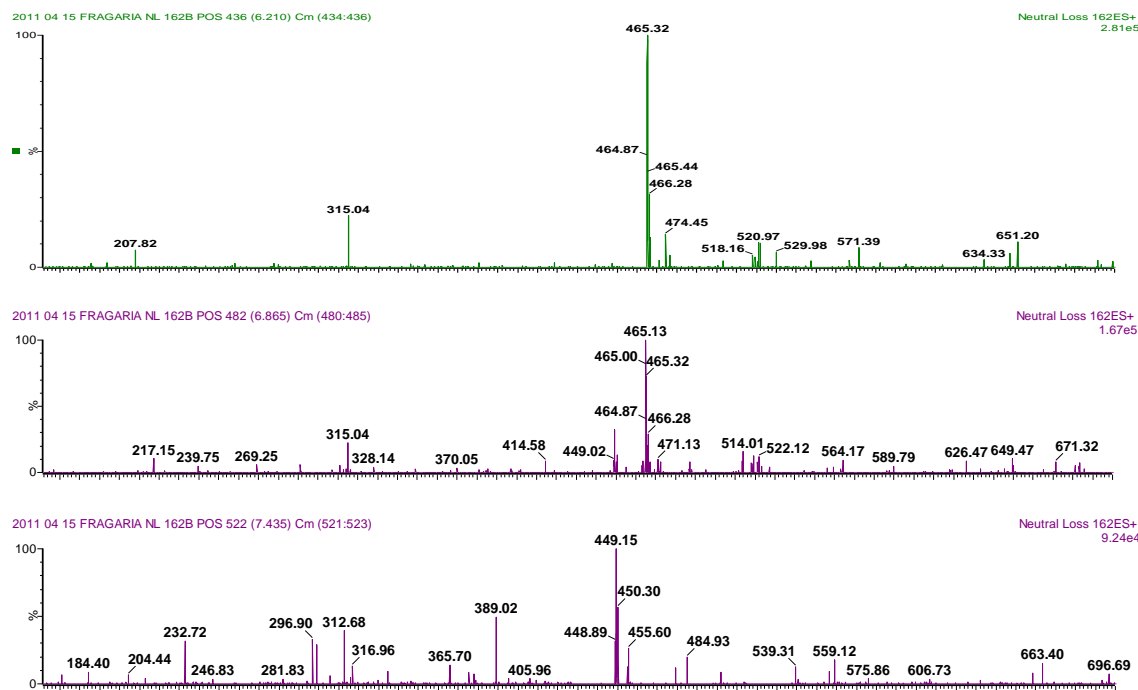
Obr. 97: NL 162 Da vo vzorke v ESI⁻ aj ESI⁺



Obr. 98: Skeny NL 162 Da v ESI⁻



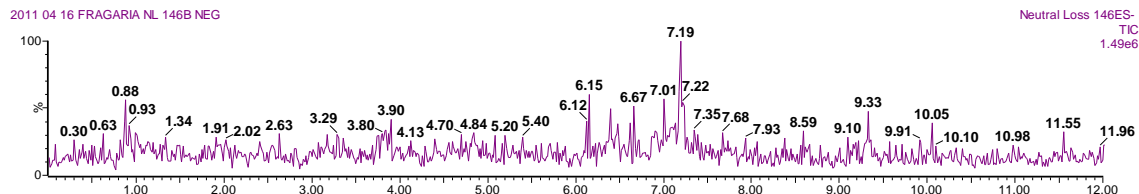
Obr. 99: Skeny NL 162 Da v ESI⁺



NL 146 vzorky

Neutrálne straty 146 Da mali spektrá v negatívne ťažko čitateľné a v pozitívne neboli žiadne straty (Obr. 100).

Obr. 100: NL 146 Da vo vzorke v ESI



NL 132 vzorky

Neutrálne straty 132 Da vo vzorke neboli patrné.


5.6 Identifikované zlúčeniny

Tabuľka 12 poskytuje súhrnný prehľad predbežne charakterizovaných a identifikovaných zlúčenín zoradených podľa retenčných časov píkovo v základnom skene vzorky

S ohľadom na štrukturálne charakteristiky flavonoidov, je možné získať informácie o aglykóne, typoch sacharidov (mono-, di-, tri-alebo tetrasaccharidy a hexóza, deoxyhexóza alebo pentóza) alebo iných substituentoch, o poradí cukrových zložiek, interglykosidických väzbách a o väzbových miestach substituentov na aglykone. Avšak, nie je možné úplne definovať štruktúru týchto zlúčenín samotným MS, pretože existuje mnoho izomérnych štruktúr [43]. Druhou prekážkou je nedostatočne presne meraná molekulová hmotnosť. Všetky zistené látky neboli plne charakterizované vzhľadom na nedostatok štandardov a možnosti využitia ďalších techník.

Chromatografický retenčný čas poskytuje ďalšie údaje o povahe látok typu sacharidov, pretože v chromatografii s reverznou fázou je o t_R známe, že je nepriamo úmerné stupni glykosylácie [43]. Retenčné časy flavonoidov na RP kolónach obvykle spĺňajú nasledujúce pravidlo: najprv sa eluujú diglykosidy, potom monoglykosidy a ako posledné aglykony. [44]. Pozície glykosylácie a metylácie môžu tiež významne ovplyvniť retenčný čas [43]

Tabuľka 12: Súhrnná tabuľka fenolických látok *Fragaria vesca* L.

<div>  <p>FRAGARIA VESCA L.:</p> </div>								
Č. píku	t _R	MW	POS	NEG	AGLY KON	NL	SUBSTITUENT	NÁZOV
1.	3,23	290	291 [M+H] ⁺ 313 [M+Na] ⁺	289 [M-H] ⁻	KAT	-	-	KATECHÍN
2.	3,80	292	293 [M+H] ⁺ 315 [M+Na] ⁺	291 [M-H] ⁻	-	-	-	-
		464	465 [M+H] ⁺	-	QCE	162-/463		QCE-HEXOSID
		640	641 [M+H] ⁺ 663 [M+Na] ⁺	639 [M-H] ⁻	QCE	-	162 + 176 hexosid + glukuronid / k.ferulová	QCE-HEXOSO-GLUKURONID
3.	6,05	-	-	-	-	-	-	-
4.	6,20	596	597 [M+H] ⁺ 619 [M+Na] ⁺	595 [M-H] ⁻	QCE	294+/597 294-/595	162 + 132 glukoso-ribosid	PELTATOSID
		464	465 [M+H] ⁺	-	QCE	162+/465	hexosid	QCE-HEXOSID

5.	6,42	610	611 [M+H] ⁺ 633 [M+Na] ⁺	609 [M-H] ⁻	QCE	308+/611 308-/609	176 +132 glukuronid / k. ferulová + pentosid	QCE-GLUKURONO- PENTOSID
		478	479 [M+H] ⁺	-	QCE	176+/479	glukuronid / k. ferulová	QCE-GLUKURONID
6.	6,92	608	609 [M+H] ⁺ 631 [M+Na] ⁺	607 [M-H] ⁻	KEM	-	176 + 146 (pos) glukuronid / k.ferulová + rhamnosid 322 (neg)	KEM-GLUKURONO- RHAMNOSID
		462	463 [M+H] ⁺	-	KEM	176+/463	glukuronid / k.ferulová	KEM-GLUKURONID
		464	-	463 [M-H] ⁻	QCE	162+/465 162-/463	hexosid	ISOQUERCITRÍN (QCE-3-GLC)
7.	7,05	594	595 [M+H] ⁺ 617 [M+Na] ⁺	593 [M-H] ⁻	KEM	308+/595 308-/593	176 + 132 glukuronid / k. ferulová + pentosid	KEM-GLUKURONO- PENTOSID
8.	7,19	478	479 [M+H] ⁺ 501 [M+Na] ⁺	477 [M-H] ⁻	QCE	176+/479 176-/477	glukuronid / k. ferulová	QCE-GLUKURONID
		462	463 [M+H] ⁺ 485 [M+Na] ⁺	461 [M-H] ⁻	316	-	glukuronid / k.ferulová	(Methoxyderivát QCE- METHYLPENTOSID)
9.	7,4	448	471 [M+Na] ⁺	-	KEM	162+/449	hexosid	KEM-3-GLC

10.	7,79	462	463 [M+H] ⁺ 485 [M+Na] ⁺	461 [M-H] ⁻	KEM	176+/463	glukuronid / k.ferulová	KEM-GLUKURONID
		316	317 [M+H] ⁺	315 [M-H] ⁻	316	-	-	(Methoxyderivát QCE -izomér rhamnetínu)
11.	8,12	680	703 [M+Na] ⁺	679 [M-H] ⁻	-	162-/679	-	od 518
		472	473 [M+H] ⁺	471 [M-H] ⁻	-	-	-	-
12.	8,69	-	-	-	-	-	-	-
13.	8,89	650	673 [M+Na] ⁺	649 [M-H] ⁻	-	162-/649	hexosid	-
		656	657 [M+H] ⁺	-	-	-	-	-
14.	9,17	302	303 [M+H] ⁺	301 [M-H] ⁻	QCE	-	-	QUERCETIN
		594	595 [M+H] ⁺	593 [M-H] ⁻	KEM	308-/593	162 + 146 176 + 132	-
15.	9,33	594	595 [M+H] ⁺ 617 [M+Na] ⁺	593 [M-H] ⁻	KEM	308+/595 308-/593 146-/593	162 + 146 Kumaroylglukosid	TILIROSID
16.	10,3	286	287 [M+H] ⁺	285 [M-H] ⁻	KEM	-	-	KAEMPFEROL

6. Záver

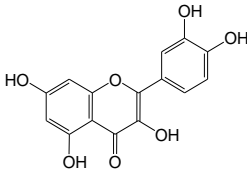
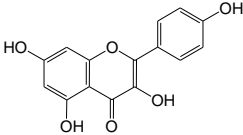
Bola vyvinutá a optimalizovaná metóda pre identifikáciu fenolických látok zo suchého lyofilizovaného extraktu *Fragaria vesca* L., ktorá je obecné použiteľná pre identifikáciu fenolických látok v rastlinných vzorkách. Separácia prebiehala na kolóne s reverznou fázou Acquity UPLC BEH SHIELD RP18 (100 x 2,1 mm, 1,7 μ m) za podmienok gradientovej elúcie metanolu a 0,1 % kyseliny mravčej ako mobilnej fázy pri nástreku 3 μ l vzorky a štandardov pri využití detekcie pomocou hmotnostného analyzátora typu trojitého kvadrupólu Quattro Micro API s ionizáciou elektrosprejom v kladnom i v negatívnom režime detekcie.

Len niekoľko látok bolo identifikovaných porovnaním s referenčnými štandardmi. Odhad štruktúry pri látkach, ku ktorým nebol k dispozícii štandard, vychádza z MS/MS analýzy. Nemohla tak byť potvrdená stopercentne identita všetkých zlúčenín. Rastlinné extrakty obsahujú veľké množstvo rôznych zlúčenín, ktoré sa môžu nachádzať v odlišných izoformách, preto je finančne náročné zaobstarať všetky potrebné štandardy, čo je dôvod pre nedostatočnú identifikáciu fenolických látok vo vzorke. Druhým dôvodom je nepresná molekulová hmotnosť zistená pomocou tohto konkrétneho LC/MS prístroja.

Štruktúry boli ďalej charakterizované predovšetkým na základe ich správania počas fragmentácie v MS/MS. Využitie boli teda nie len základné skeny ale aj skeny produktových iónov, skeny neutrálnych strát a rekonštruované iónové chromatogramy vybraných hmotností (RIC). Posledné menované boli veľmi dôležité pre identifikáciu zlúčenín prítomných v malom množstve. Vďaka optimalizovaným LC/MS podmienkam, väčšina fenolových zlúčenín poskytla dostatočné odozvy pre $[M-H]^-$ a $[M+H]^+$ ióny, ktoré mohli byť vystavené MS/MS analýzam.

UHPLC-MS/MS analýza suchého jahodového extraktu viedla k predbežnej charakterizácii niekoľkých fenolických zlúčenín, vrátane katechínu, flavonoidov peltatosidu a tilirosidu, aglykonov kaempferolu a quercetínu a ich derivátov. Jednotlivých sacharidových derivátov sa vo vzorke nachádza viac ale ich pozíciu na aglykone sa nám nepodarilo určiť. Celkom 20 zlúčenín bolo identifikovaných, alebo predbežne charakterizovaných (viz Tabuľka 12 na konci kapitoly 5.6). Tabuľka 13 zhrňa najčastejšie flavonoidy vyskytujúce sa vo vzorke odvodené od aglykonu quercetínu a kaempferolu.

Tabuľka 13: Zhrnutie flavonoidov odvodených od aglykonu quercetínu a kaempferolu vo vzorke

Zhrnutie flavonoidov v suchom extrakte z jahodových listov	
quercetin	kaempferol
	
pentosid	glukosid
ribo-glukosid (peltatosid)	ribo-glukosid
glukosid (isoquercitrin)	feruoyl-pentosid
glukuronid	glukuronid
	rhamno-glukosid
	kumaroyl-glukosid (tilirosid)

Je potrebné previesť ďalšie potvrdenie predpokladanej štruktúry s pomocou hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením, ktorá meria správnu a presnú hmotu (HRMS), alebo iných techník (napr. NMR), pretože niektoré zlúčeniny majú takmer rovnakú MW ako sme napríklad videli na neutrálnej strate 146 Da, kde u tilirosidu sa nejednalo o predpokladanú methylpentózu ale o kyselinu kumarovú, čo sme v tomto prípade potvrdili pomocou referenčného štandardu.

7. Použitá literatura

- [1] S. C. Moldoveanu, V. David, Essentials in Modern HPLC Separations, Newnes, 2012.
- [2] V. R. Meyer, Practical High-Performance Liquid Chromatography, John Wiley & sons, 2010.
- [3] Český liekopis 2009, Grada Publishing a.s., 2009.
- [4] Y. V. Kazakevich, R. LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, John Wiley & Sons, 2007.
- [5] Xin Zhang, Monoliths and Small Particle-packed Columns for Liquid Chromatography, ProQuest, 2007.
- [6] <http://www.hplc.cz/>, august 2012.
- [7] http://users.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/separa.htm, november 2012.
- [8] http://www.restek.com/Technical-Resources/Technical-library/Pharmaceutical/pharm_A016, január 2013
- [9] <http://www.waters.com/waters/home.htm>, október 2012.
- [10] M. Waksrudzka-Hajnos, J. Sherma, High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis, CRC Press, 2010.
- [11] I. Jančářová, L. Jančář, Analytická chemie, MZLU Brno, 2003.
- [12] <http://web.vscht.cz/poustkaj/>, september 2012.
- [13] J. Karlíček a kol., Analytická chemie pro farmaceuty, Karolinum, 2005.
- [14] L. R. Snyder et al., Introduction to Modern Liquid Chromatography, John Wiley & sons, 2011.
- [15] L. Nováková et al., Anal. Chim. Acta, 656 (2009) 8 - 35
- [16] M. Kalina, CHEMAGAZÍN, ročník XX číslo 2 (2010) 13 - 14.
- [17] K. Benešová, Chem. Listy, 106 (2012) 672 - 676.
- [18] S. M. Chesnut, J. J. Salisbury, J. Sep. Sci., 30 (2007) 1183 - 1190.
- [19] J. Světlík, Molekulová spektroskopie a optické metody, vydavatel'stvo UK, 2006.
- [20] <http://holcapek.upce.cz/>, december 2011.
- [21] J. Barker, D. J. Ando, Mass Spectrometry: Analytical Chemistry by Open Learning, John Wiley & Sons, 1999.
- [22] Š. Kováč, J. Leško, Spektrálne metody v organickej chémii, ALFA, 1980.
- [23] V. Milata, P. Segel'a, Vybrané metody molekulovej spektroskopie, vydavatel'stvo STU, 2007.
- [24] M. S. Lee, M. Zhu, Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Disposition: Basic Principles and Applications, John Wiley & Sons, 2011.

- [25] M. A. Grayson, *Measuring Mass from Positive Rays to Proteins*, Chemical Heritage Press, 2002.
- [26] K. Downard, *Mass spectrometry: A foundation course*, Royal Society of Chemistry, 2004.
- [27] L. Couchman, P. E. Morgan, *Biomed. Chromatogr.*, 25 (2011) 100 - 123.
- [28] A. Cappiello, *Advances in LC-MS Instrumentation*, Elsevier, 2007.
- [29] R. B. Cole, *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications*, John Wiley & Sons, 2010.
- [30] <http://www.vscht.cz/anl/matejka/ACH2-02-MS.pdf>, december 2012.
- [31] E. de Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, 2007.
- [32] A. Kraj et al., *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, John Wiley & Sons, 2008.
- [33] J. H. Gross, P. Roepstorff, *Mass Spectrometry: A Textbook*, Springer, 2011.
- [34] J. R. Chapman, *Practical Organic Mass Spectrometry: A Guide for Chemical and Biochemical Analysis*, John Wiley & Sons, 1995.
- [35] F. A. Mellon et al., *Mass Spectrometry of Natural Substances in Food*, Royal Society of Chemistry, 2000.
- [36] M. Holčapek et al., *J. Chromatogr. A.*, 1259 (2012) 3 - 15.
- [37] P. S. Kalsi, *Spectroscopy of Organic Compounds*, New Age International, 2007.
- [38] M. McMaster, *LC/MS: A Practical User's Guide*, John Wiley & Sons, 2005.
- [39] R. E. Ardrey, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, 2003.
- [40] M. S. Lee, *LC/MS Applications in Drug Development*, John Wiley & Sons, 2002.
- [41] R. B. van Breemen et al., *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery, and Development*, John Wiley & Sons, 2010
- [42] B. Abad- García et al., *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 22 (2008) 1834 - 1842.
- [43] Ch. Cavaliere et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 3143 - 3158.
- [44] Min Ye et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 1469 - 1484.
- [45] F. Cuyckens, M. Claeys, *J. Mass Spectrom.*, 39 (2004) 1 - 15.
- [46] K. M. Kalili, A. de Villiers, *J. Sep. Sci.*, 30 (2011) 854 - 876.
- [47] A. T. Hukkanen et al., *J. Agric. Food Chem.*, 55 (2007) 1862 - 1870.
- [48] E. Grotewold, *The Science of Flavonoids*, Springer, 2007.

- [49] Zhimin Xu, R. L. Howard, Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, John Wiley & Sons, 2012.
- [50] E. Hvattum, D. Ekeberg, J. Mass Spectrom. 38 (2003) 43 - 49.
- [51] E. de Rijke et al., J. Chromatogr. A., 1112 (2006) 31 - 63.
- [52] R. March, J. Brodbelt, J. Mass Spectrom., 43 (2008) 1581 - 617.
- [53] O. W. Thom, Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. místo neznámé : Gera, 1985.
- [54] <http://www.agromap.net/LjekoviteBiljke/Prikaz/56-FRAGARIA-VESCA-L-Sumska-jagoda>, november 2012.
- [55] K. Hanhineva, Metabolic Engineering of Phenolic Biosynthesis Pathway and Metabolite Profiling of Strawberry (*Fragaria x ananassa*), Doctoral dissertation, Kuopio, 2008.
- [56] I. Mudnic et al., Phytomedicine, 16 (2009) 462 - 469.
- [57] L. Nováková et al., Talanta 80 (2010), 1970 - 1979
- [58] D. Tsimogiannis et al., Molecules, 12 (2007) 593 - 606.
- [59] R. March, J. Brodbelt, J. Mass Spectrom., 43 (2008) 1581 - 1617.
- [60] Fabre et al., J. Am Soc Mass Spectrom., 12 (2001) 707 - 715.
- [61] R. E. March, X.-S. Miao, Int. J. Mass Spectrom., 231 (2004) 157 - 167.
- [62] Wolfender et al., Analusis. 28 (2000) 895-906.
- [63] R. E. March et al., Int. J. Mass Spectrom., 284 (2006) 61 - 85.
- [64] H. McNab et al., Int. J. Mass Spectrom., 284 (2009) 57 - 65.
- [65] <http://www.sigmaaldrich.com/slovakia.html>, november 2012.
- [66] Databáza SciFinder, júl 2012.
- [67] K. Ablajan et al., J. Mass Spectrom., 41 (2006) 352 - 360.

8. Prílohy

8.1 Abstrakt zo Studentské vědecké konference 2013

Identification of phenolic compounds in leaves of *Fragaria vesca* L. using UHPLC-MS/MS

Kmet'ová I¹, Spilková J², Solich P¹, Nováková L¹

¹ Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry

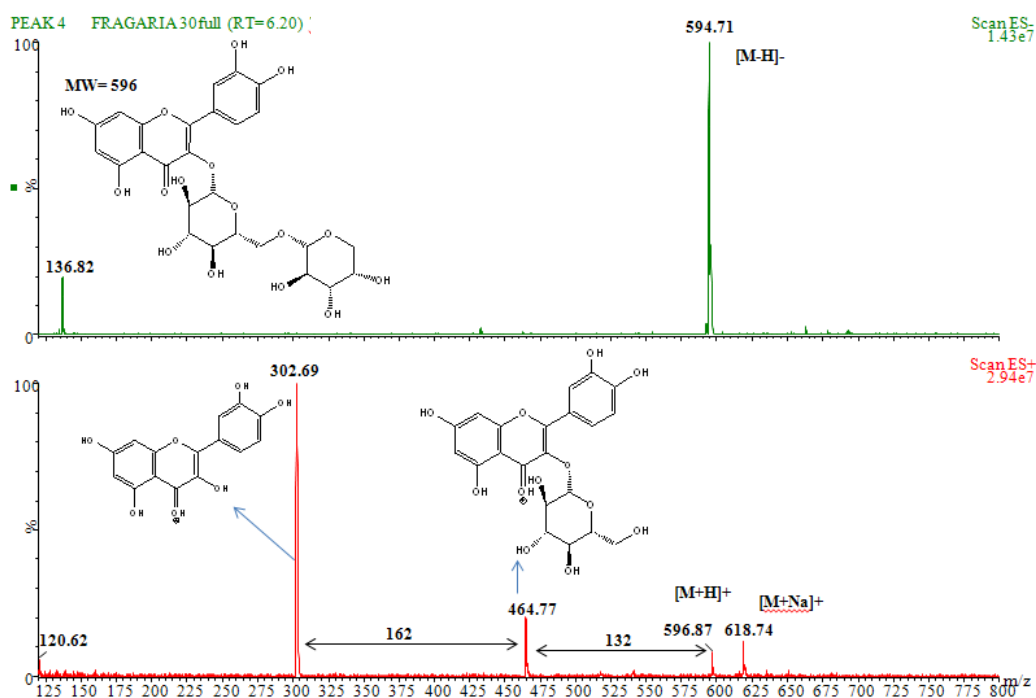
² Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Pharmacognosy

e-mail: kmeti6aa@faf.cuni.cz

The aim of this study was identification of phenolic compounds in dry lyophilized water extract of leaves of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) using ultra-high performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) system, advantageous in identification of complex plant samples.

Phenolic compounds represent a group of very complex naturally occurring molecules in plants, possessing a wide variety of biological and physiological functions and acting as chemotaxonomic marker substances. This work was focused on flavonoids and related substances.

For separation, UHPLC was used instead of more common HPLC due to its much higher separation efficiency that is crucial for successful separation of complex samples. Moreover, UHPLC enabled reduction of analysis time. Determination of structures of phenolics was based on evaluation and comparison of MS and MS/MS spectra in both negative and positive ESI ion modes. Full scan spectra, product ion spectra, neutral loss scans and reconstructed ion chromatograms of selected masses were used. The latter was very important in order to identify low abundant compounds. Neutral loss scan was especially valuable for the identification of sugars in the structure of phenolic compounds. For some structures also reference standards were available, therefore the identification was performed using MS data and retention times as well.



UHPLC-MS/MS analysis of dry strawberry extract led to tentative characterization of variety of phenolic compounds including catechin, flavonoids peltatoside and tiliroside, aglycons of kaempherol and quercetin and their derivatives. The position of sugar moiety on flavonoid skeleton was not yet elucidated, except for the compounds for which reference standards were available.

Summary of flavonoids in dry strawberry leaves extract	
quercetin	kaempherol
pentoside	glucoside
ribo-glucoside (peltatoside)	ribo-glucoside
glucosid (isoquercitrin)	feruloyl-pentoside
glucuronide	glucuronide
	rhamno-glucoside
	coumaroyl-glucoside (tiliroside)

This study was supported by research projects of Charles University in Prague by UNCE 204026/2012 and SVV 267007.

8.2 Abstrakt z konferencie v Ríme, november 2011

10th Indo-Italian Workshop on Chemistry and Biology of Antioxidants

APPLICATION OF UHPLC-MS/MS TECHNIQUE IN ANALYSIS OF PHENOLIC COMPOUNDS

Lucie Nováková¹, Ivana Kmeťová¹, Anna Vildová², Petr Solich¹

Charles University in Prague, Czech Republic: 1Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry, Hradec Králové, Czech Republic, 2Department of Crop Production, Faculty of Agrobiological Sciences, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Kamýcká 129, 165 21 Prague 6, Czech Republic

Phenolic fraction of a plant extract is important due to its antioxidant properties. To obtain more precise information on antioxidant activity it is important to develop sensitive and selective analytical methods for identification and quantitation of phenolic compounds in plant material. Structural similarity and various isomeric forms (structural as well as stereoisomers) render the method development rather challenging. Quantitative analysis on the other hand involves determination of wide range of analytes at different concentration levels in complex matrices, which requires wide linear range and selective detection.

Ultra-high performance chromatography coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) of triple quadrupole type is a convenient tool for both purposes. Moreover, its enhanced efficiency, miniaturization and higher speed of analysis bring further advantages such as decrease in analysis time, possibility to separate isomers and lower solvent and sample consumption. For quantitative purposes selected reaction monitoring (SRM) mode is important due to high selectivity and sensitivity. This approach was used in analysis of tea catechins, where all eight structural isomers were well separated and quantitatively evaluated within the run time of 2.5 minutes. Similarly, characteristic phenolic compounds of Chamomile and Chamomile tea extracts were determined with UHPLC-MS/MS method in SRM mode.

Qualitative assessment using triple quadrupole provides substantial advantages in terms of various tandem mass spectrometry scans (product ion scan, precursor ion scan and neutral loss scan). Neutral loss scan is especially valuable for identification of flavonoids containing sugar moieties, as sugars are easily losing this moiety during MS/MS fragmentation providing neutral loss. UHPLC-MS/MS using qualitative scans was applied in evaluation of phenolic profiles in various plants, such as *Cichorium intybus*, *Fragaria vesca*, *Rubus fruticosus*, *Rubus idaeus* and many others.

The authors gratefully acknowledge financial support of MSM0021620822.

8.3 31st IMMS Palermo, máj 2013

Informal Meeting on Mass Spectrometry

8.3.1 Abstrakt

31st IMMS 2013 PALERMO INFORMAL MEETING ON MASS SPECTROMETRY

P28

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN LEAVES OF *FRAGARIA VESCA* USING UHPLC-MS/MS

Lucie Nováková¹, Ivana Kmetřová¹, Jiřina Spilková², Petr Solich¹

¹Department of Analytical Chemistry, ²Department of Pharmacognosy
Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové,
Czech Republic

Keywords: UHPLC-MS/MS, *Fragaria vesca*, phenolic compounds, neutral loss scan

Background: Phenolic compounds, particularly flavonoids, are known to have an antioxidative potential and to protect against chronic diseases, such as tumors or heart disorders. Recently, the nutritional and health features of strawberry have been emphasized more, which can be associated with the presence of polyphenols in their organs. Most of studies were focused on strawberry fruits, while strawberry leaves have not been explored so far.

Objective: The aim of the work was to develop UHPLC-MS/MS method for the identification of phenolic compounds in dry lyophilized water extract of leaves of wild *Fragaria vesca* (*Rosaceae*).

Methods: Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) using BEH Shield RP18 stationary phase with 1.7 μ m particles was employed for separation. Tandem mass spectrometry using MS and MS/MS experiments, especially product ion scan and neutral loss scan, were used for the identification of compounds in both positive and negative ion mode.

Results: Phenolic compounds in the leaves of *Fragaria vesca* were identified. Mostly, various glycosides of quercetin and kaempferol were found. Ultra-highly efficient chromatographic separation was necessary in order to separate various isomers of flavonoids often having the same structure and differing only in position of sugar moiety. The type of sugar was confirmed using neutral loss scan and product ion spectra in both positive and negative ion mode in most instances. Monosaccharides, disaccharides or phenolic moieties were found to modify the two aglycone structures. For some compounds reference standards were available, which was helpful in structure elucidation and which enabled also use of retention time as another identification parameter.

Conclusions: Similarly to strawberry fruits, strawberry leaves contained an important amount of phenolic compounds, mainly glycosides of quercetin and kaempferol.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge financial support of project 204026/2012 UNCE.

Presenting and corresponding author: Lucie Nováková, nol@email.cz, +420 495 067 381
Presentation type: poster

8.3.2 Poster



IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN LEAVES OF *FRAGARIA VESCA* USING UHPLC-MS/MS

Lucie Nováková¹, Ivana Kmeťová¹, Jiřina Spilková², Petr Solich¹

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové

²Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové

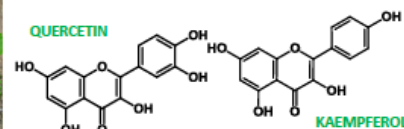
INTRODUCTION AND THE AIM OF THE WORK



Phenolic compounds, particularly flavonoids, are known to have an antioxidant potential and to protect against chronic diseases, such as tumors or heart disorders. Recently, the nutritional and health features of strawberry have been emphasized more, which can be associated with the presence of polyphenols in their organs.

Most of studies were focused on strawberry fruits, while strawberry leaves have not been explored so far.

The aim of the work was to develop UHPLC-MS/MS method for the identification of phenolic compounds in dry lyophilized water extract of leaves of wild *Fragaria vesca* (*Rosaceae*). Expected compounds should mostly be derivatives of quercetin and kaempferol.



EXPERIMENTAL DESIGN

STATIONARY PHASE: Acquity BEH Shield RP18, 100 x 2.1 mm/1.7 μm

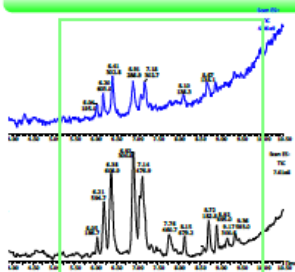
MOBILE PHASE: 0.1 % formic acid, MeOH

gradient elution from 15 – 78 % of ACN and formic acid 0.1 % in 10 min

MS experiments: MS sken, product ion scan at various collision energies and neutral loss scan (see table)

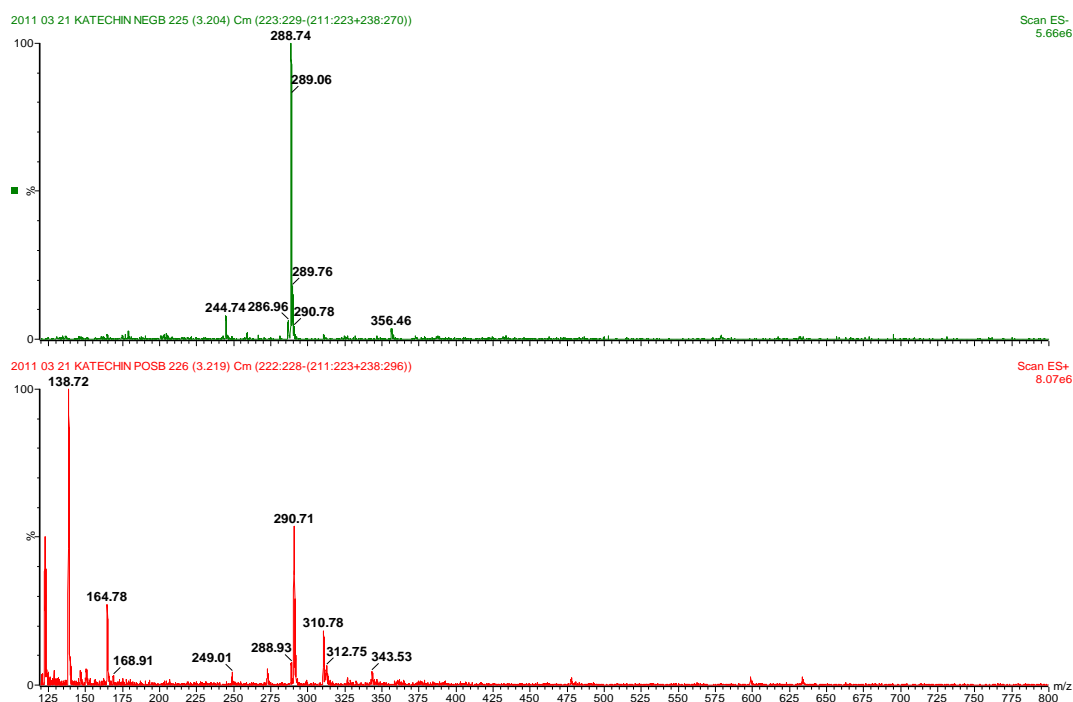
SUGARS	FORMULA	MW	NL
monosaccharides			
HEXOSE	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	162.0528
METHYLPENTOSE	C ₅ H ₁₀ O ₅	164.0685	146.0579
PENTOSE	C ₅ H ₁₀ O ₅	150.0528	132.0423
disaccharides			
HEXOSYLHEXOSE	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.1162	324.1056
METHYLPENTOSYLHEXOSE	C ₁₃ H ₂₄ O ₁₀	326.1213	308.1107
PENTOSYLHEXOSE	C ₁₁ H ₂₀ O ₁₀	312.1056	294.0951
phenolic acids			
benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂	122.0368	104.0262
syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅	198.0528	180.0422
p-coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.0473	146.0367
caffeic acid	C ₉ H ₈ O ₄	180.0423	162.0317
ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.0579	176.0473
sinapic acid	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.0685	206.0579

UHPLC-MS/MS RESULTS

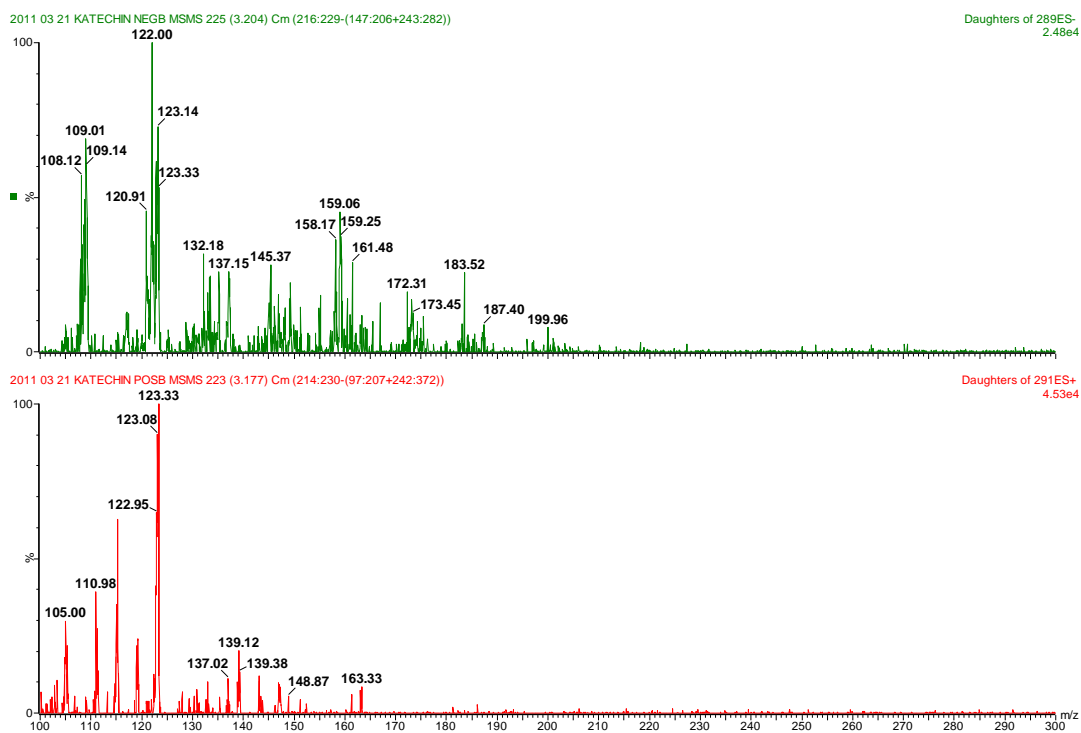


8.4 MS a MS/MS spektrá vybraných referenčných štandardov

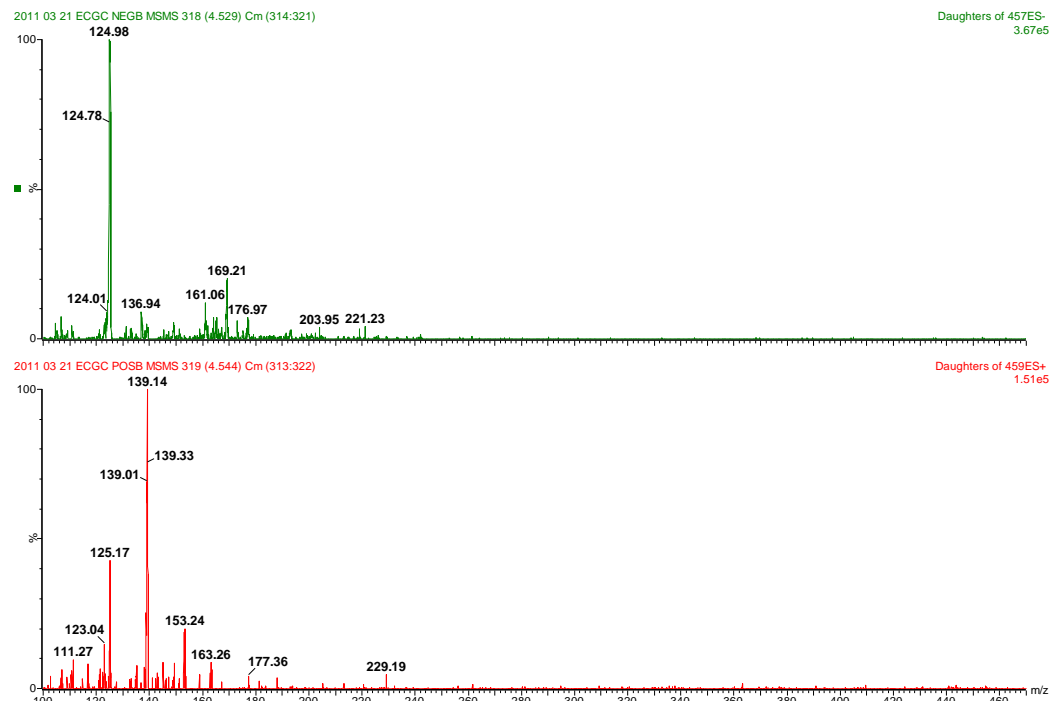
Obr. 101: MS spektrá štandardu katechínu s $t_R = 3,2$ v ESI⁺ aj ESI⁻



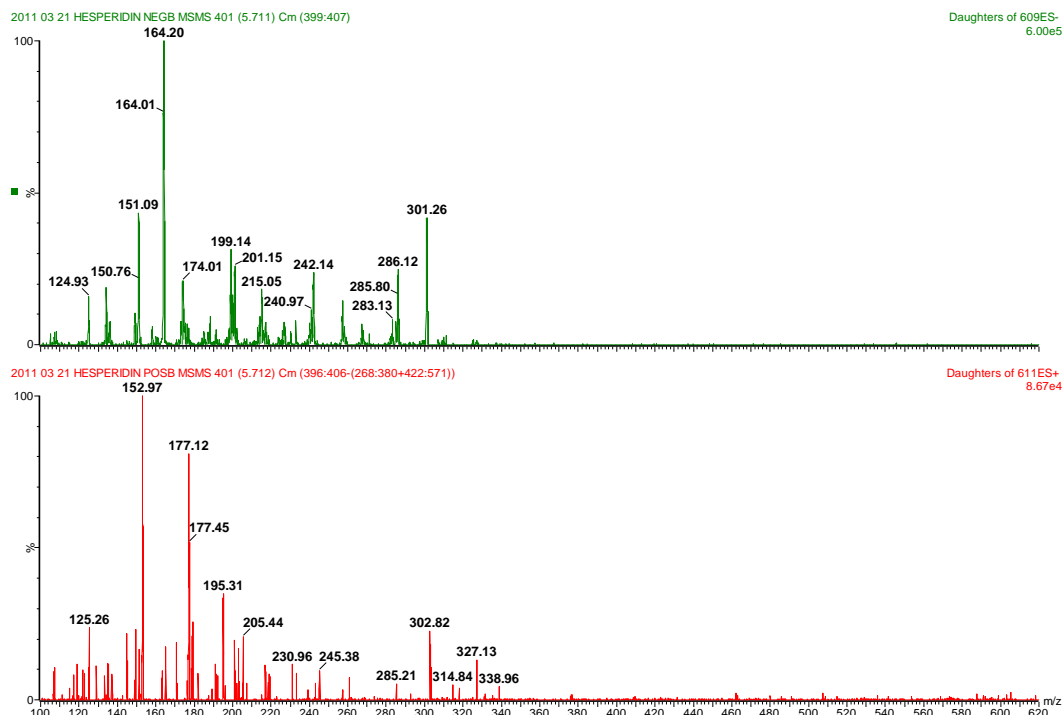
Obr. 102: Spektrá fragmentácie katechínu ESI/ESI⁺



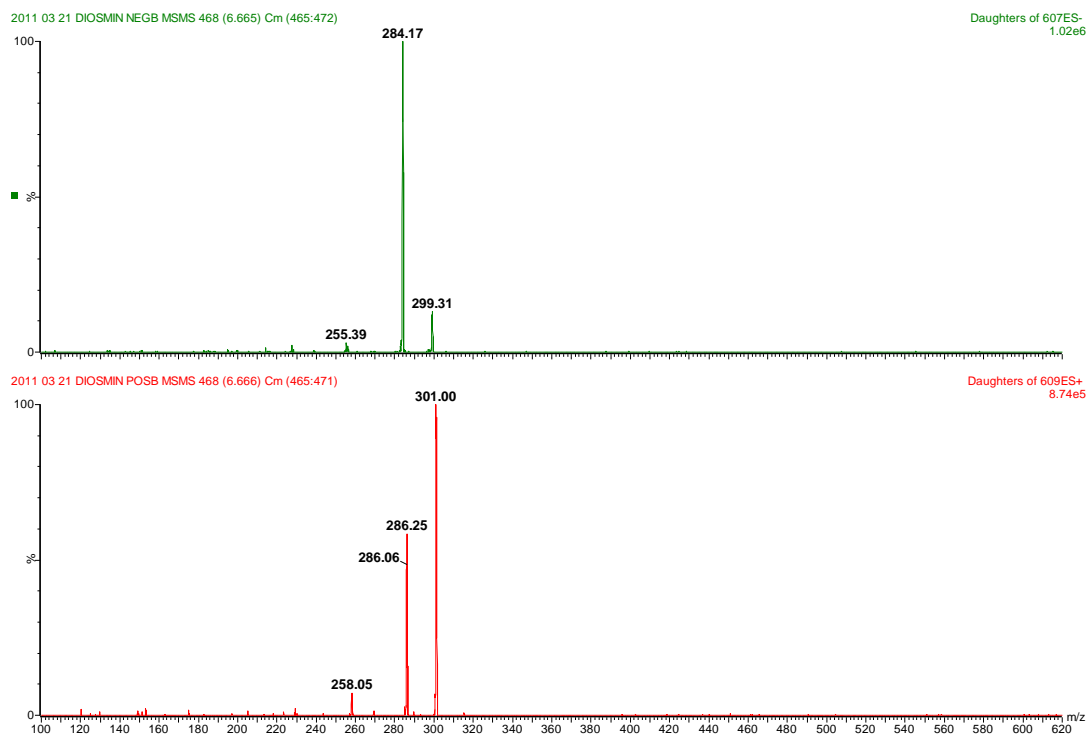
Obr. 103: Fragmentačné spektrá štandardu epigallokatechín gallátu v ESI⁺ a ESI⁻ s t_R = 4,5



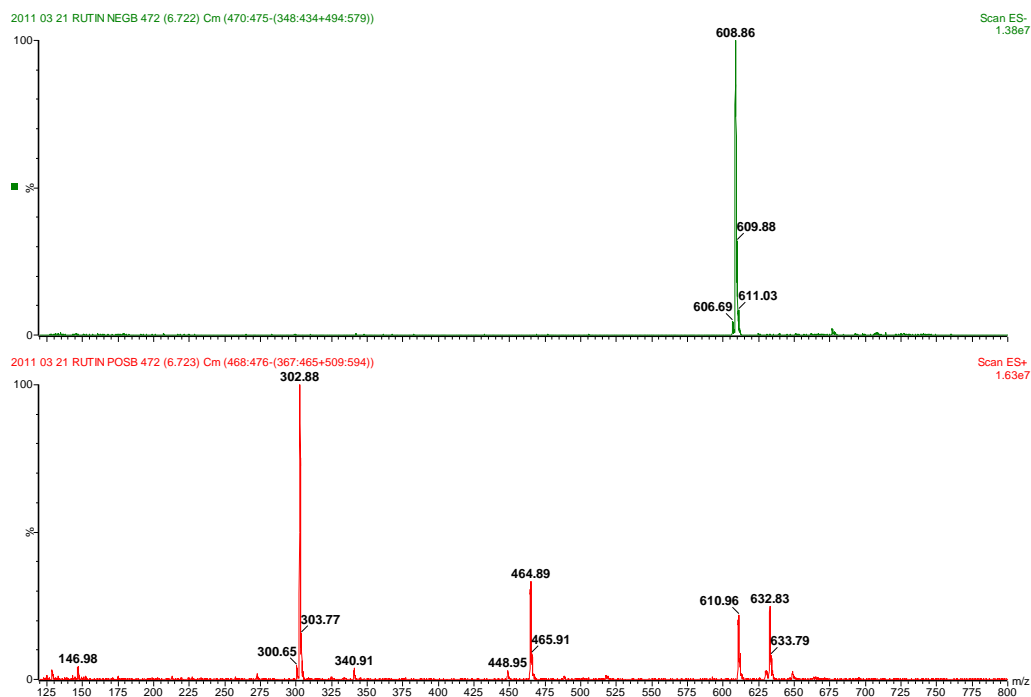
Obr. 104: Fragmentačné spektrá štandardu hesperidínu v ESI⁺ a ESI⁻ s t_R = 5,7



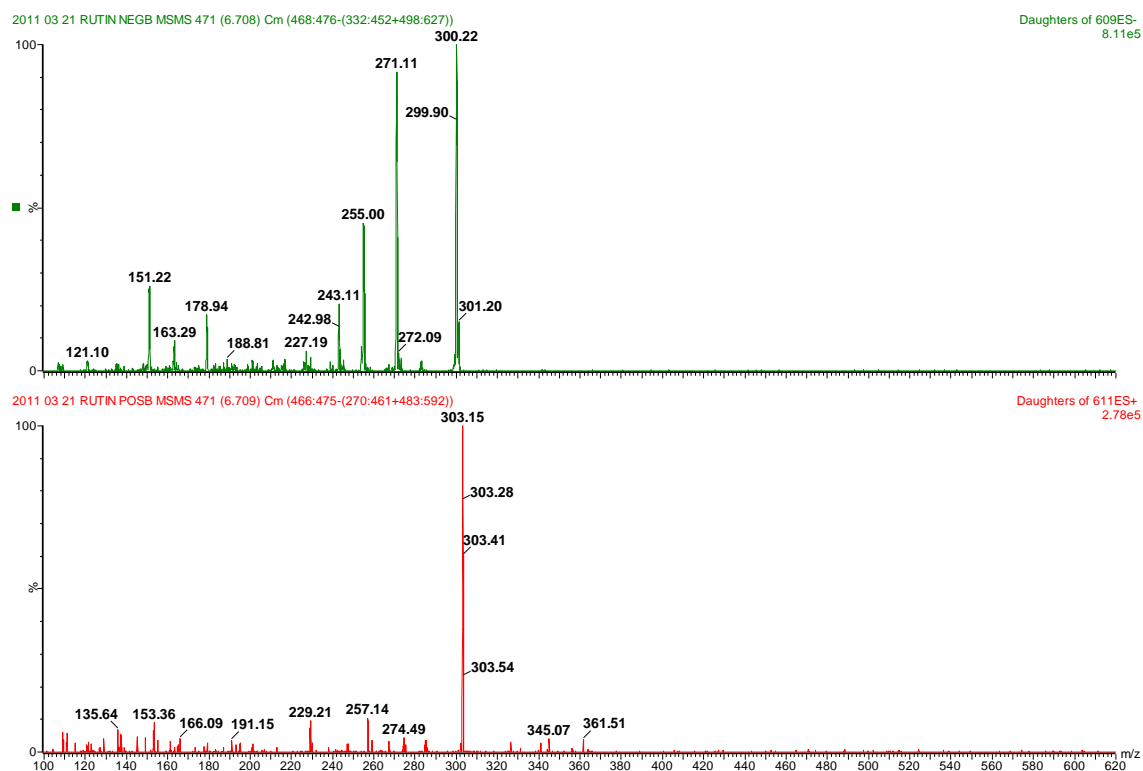
Obr. 105: Fragmentačné spektrum pre štandard diosmín s $t_R = 6,6$ v ESI/ESI⁺



Obr. 106: Spektrum štandardu rutínu s $t_R = 6,7$ v ESI/ESI⁺



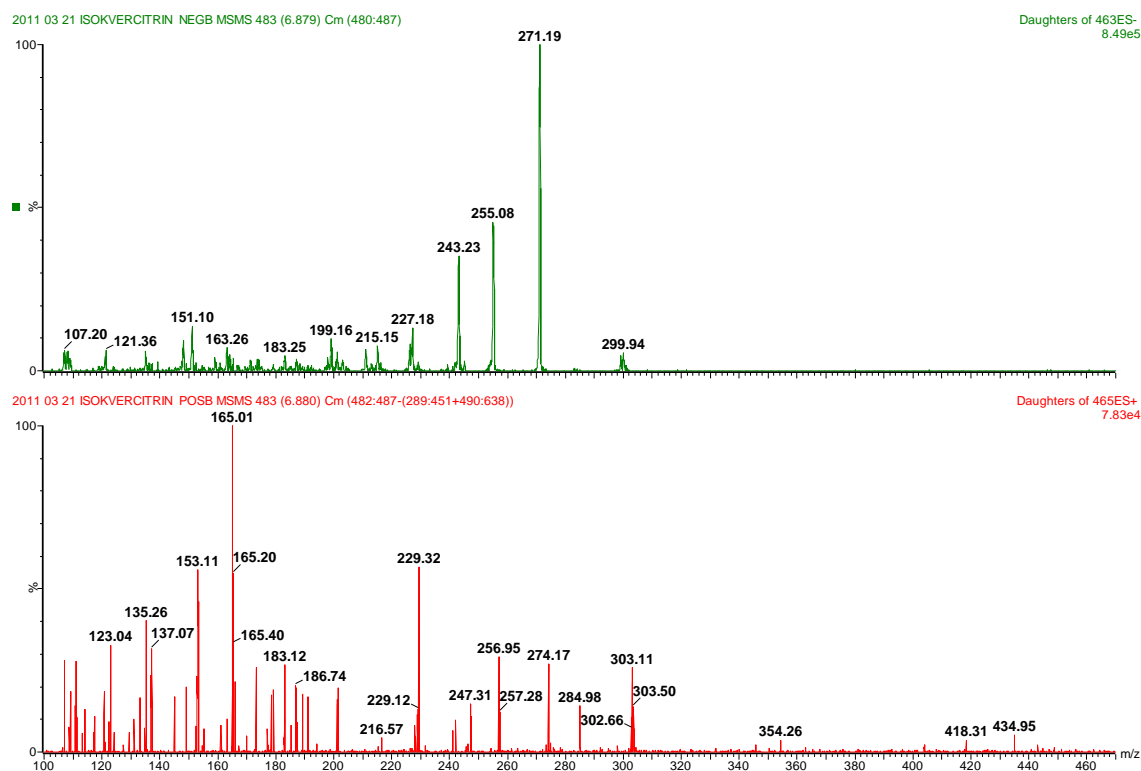
Obr. 107: Fragmentačné spektrá štandardu rutínu v ESI⁺ a ESI⁻ s t_R = 6,7



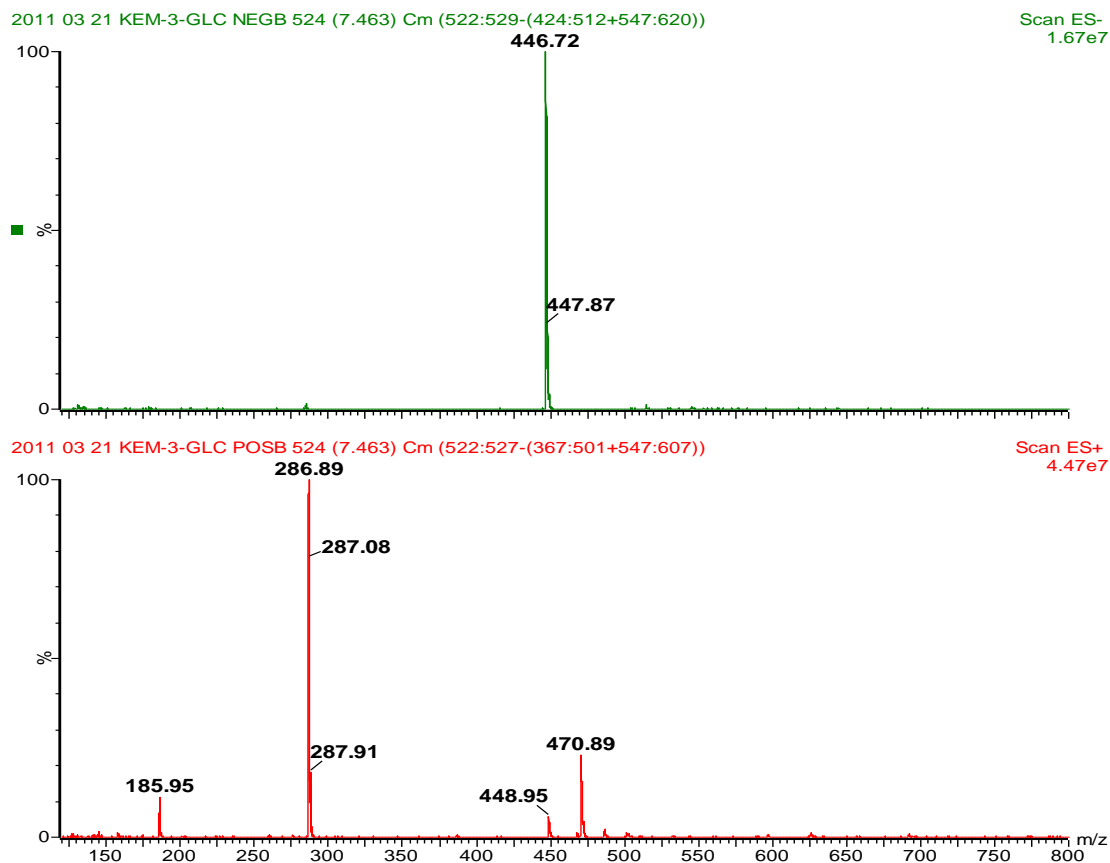
Obr. 108: Spektrum štandardu isokvercitrínu s t_R = 6,9



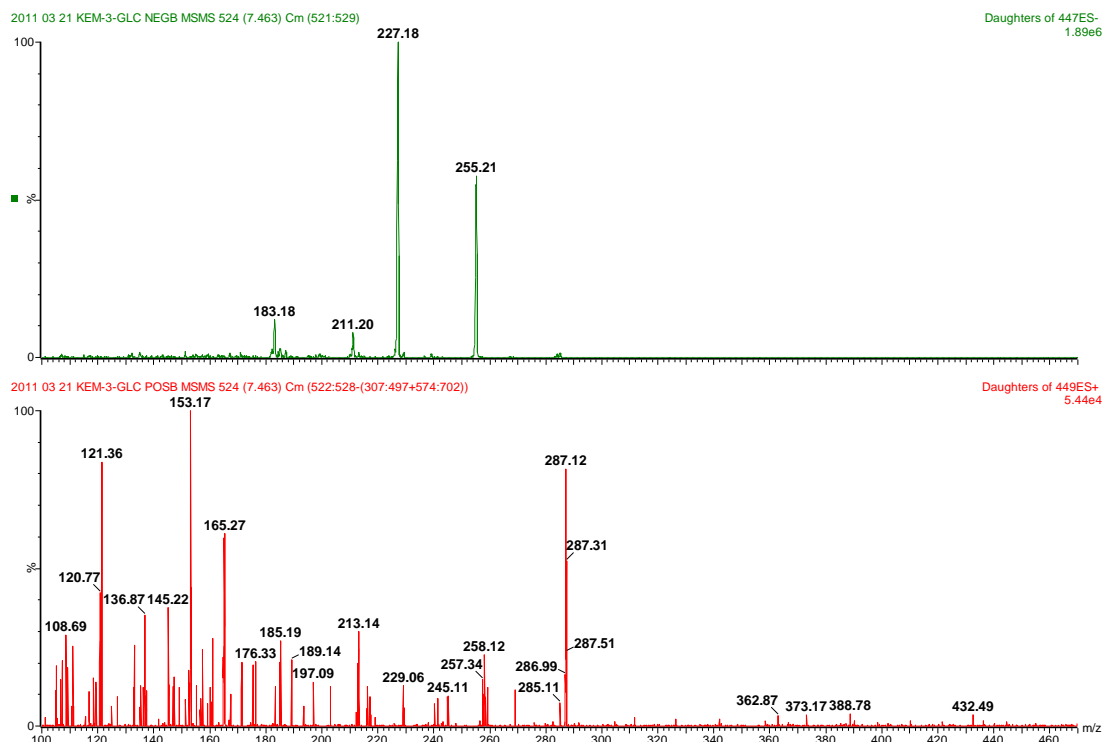
Obr. 109: Fragmentačné spektrá pre štandard isokvercitrín v ESI⁻ aj ESI⁺



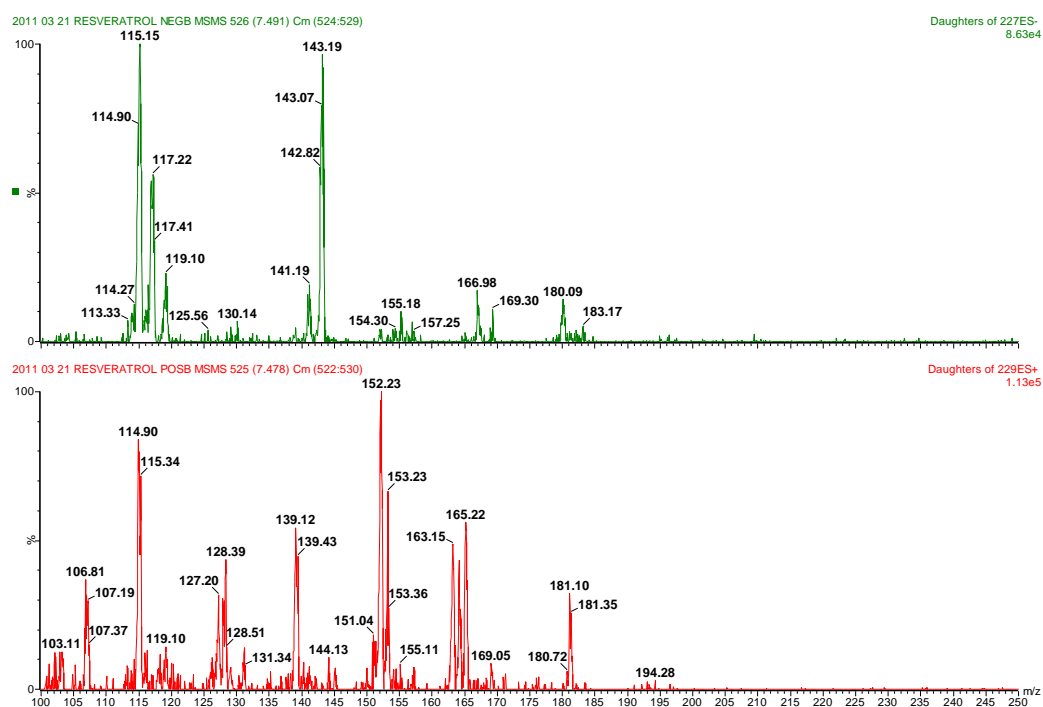
Obr. 110: Spektrum štandardu kaempferol-3-glukosidu s $t_R = 7,4$



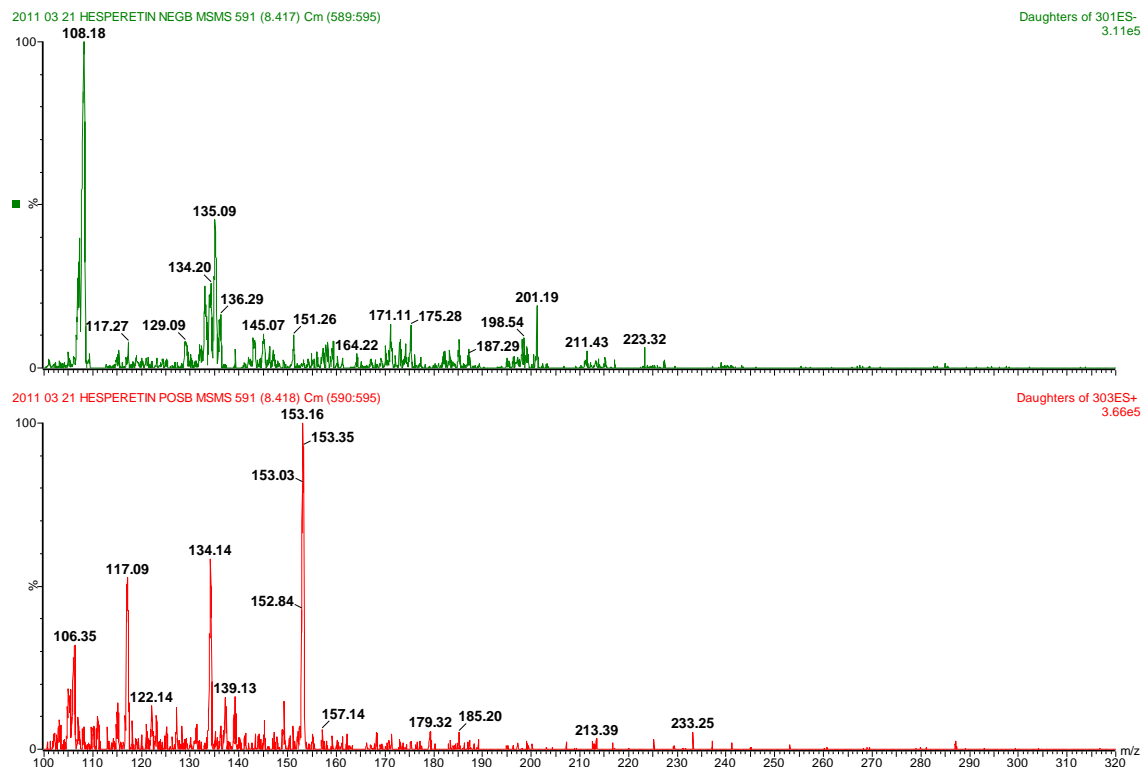
Obr. 111: Fragmentačné spektrá pre štandard kaempferol-3-glukosid v ESI⁻ aj ESI⁺



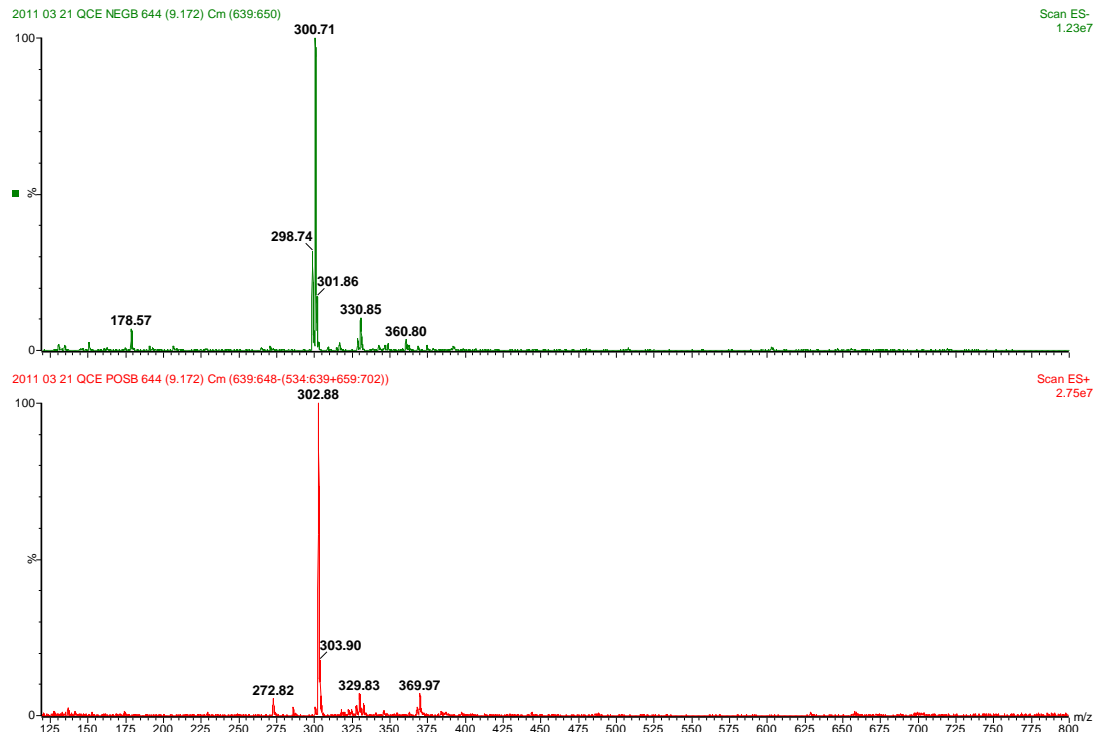
Obr. 112: Fragmentačné spektrá pre štandard resveratrol v ESI⁻ aj ESI⁺ s $t_R = 7,5$



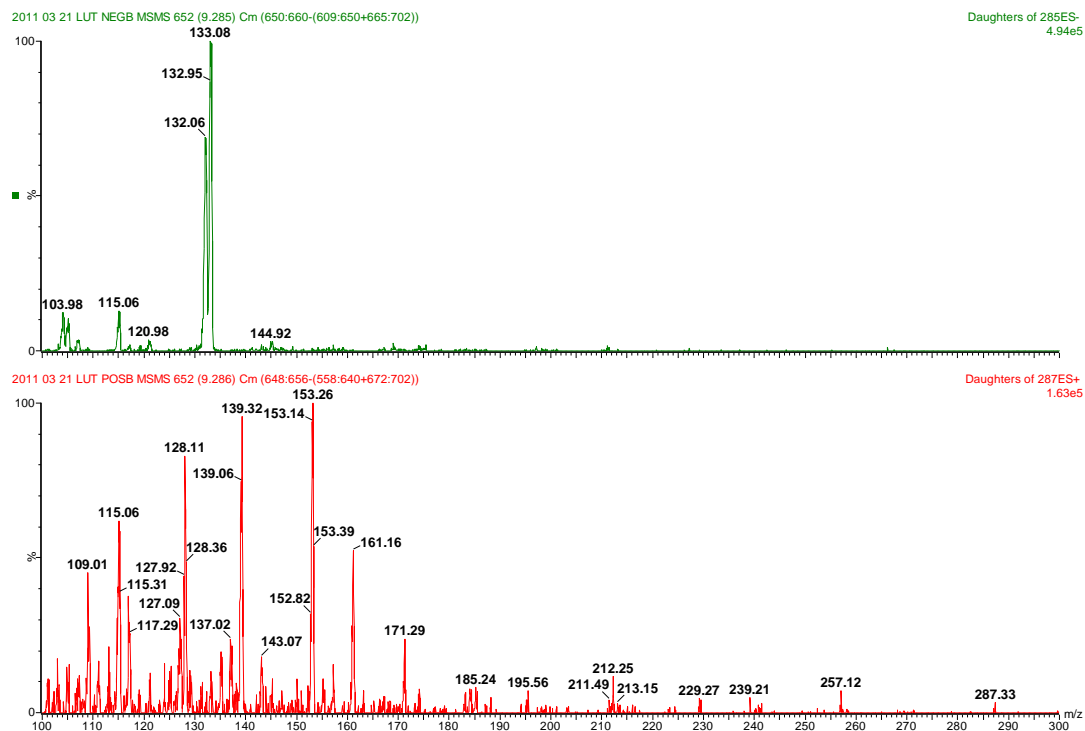
Obr. 113: Fragmentačné spektrá pre štandard hesperetín v ESI⁻ aj ESI⁺ s $t_R = 8,4$



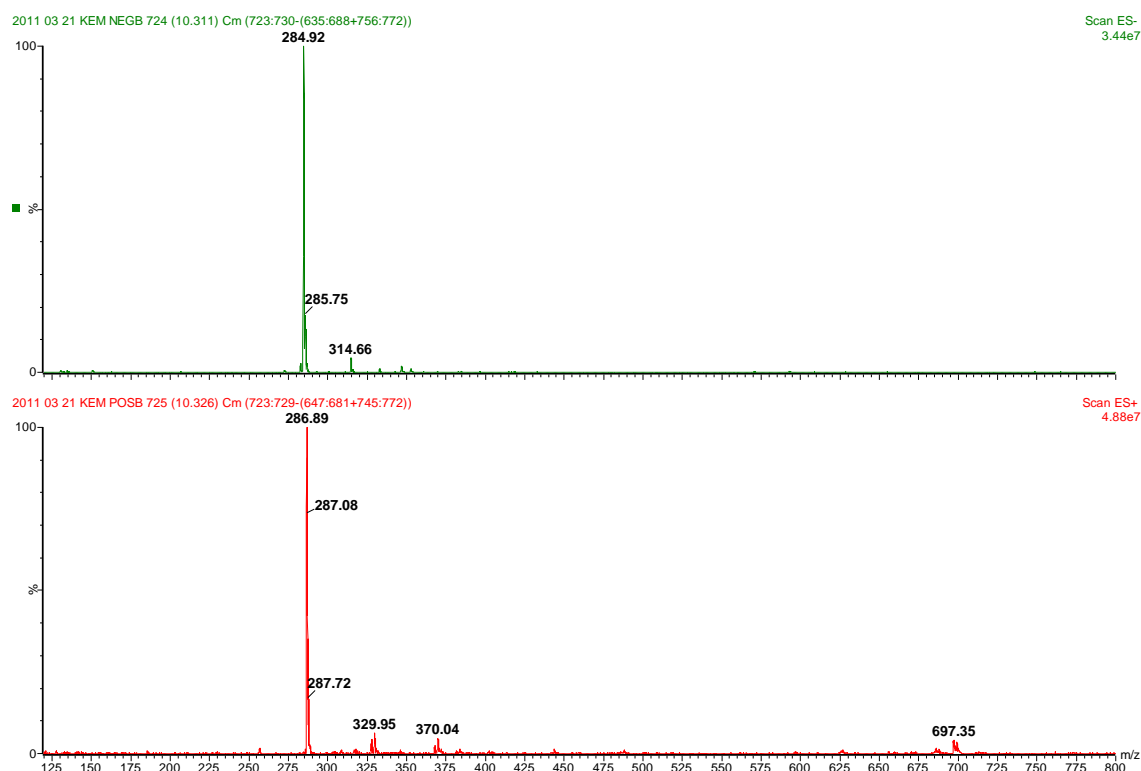
Obr. 114: Spektrum štandardu quercetínu s $t_R = 9,17$



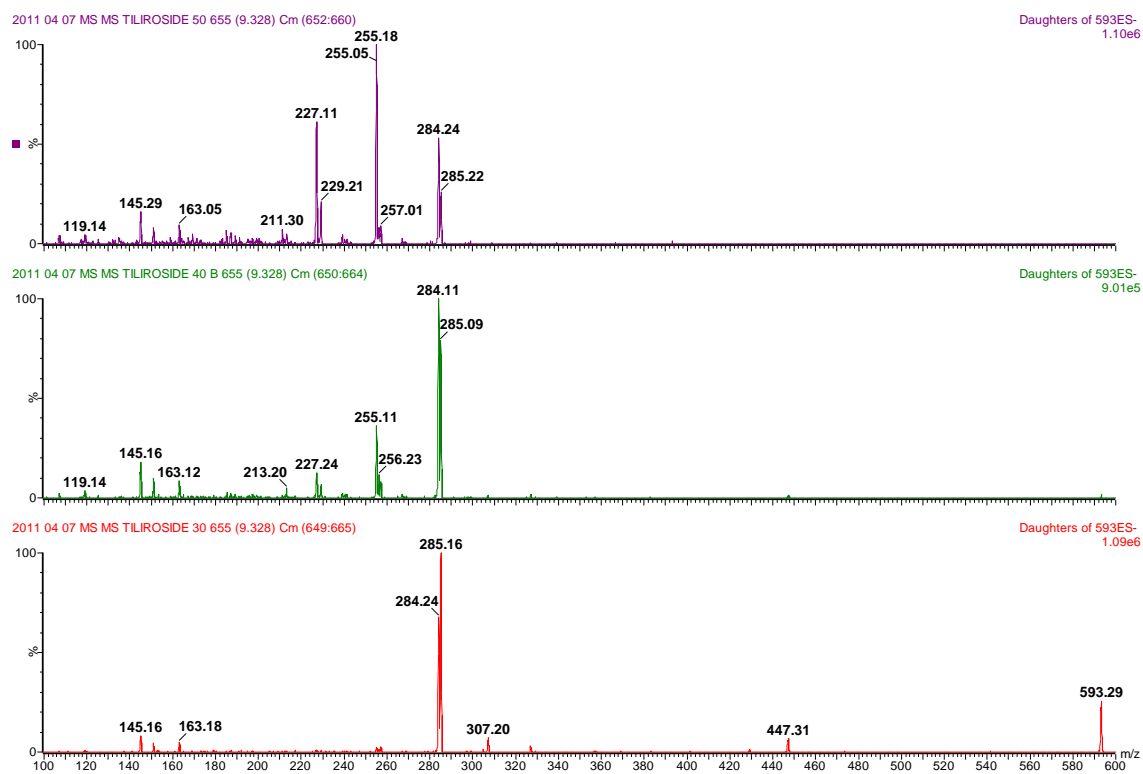
Obr. 115: Fragmentačné spektrá pre štandard luteolín v ESI⁻ aj ESI⁺ s $t_R = 9,3$



Obr. 116.: Spektrum štandardu KEM s $t_R=10,3$



Obr. 117.: Fragmentačné spektrá štandardu tilirosidu pri kolíznach energiách 30, 40 a 50 eV



Obr. 118.: Fragmentačné spektrá tilirosidu pri kolíznych energiách 10 a 30 eV v ESI⁺

